

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANNIELE MIRANDA BACILA

EFEITO DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS CONVENCIONAIS NO RESÍDUO
DA NICARBAZINA E MONITORAMENTO DO SEU PRODUTO DE
DEGRADAÇÃO NA CARNE DE FRANGO

CURITIBA

2019

DANNIELE MIRANDA BACILA

EFEITO DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS CONVENCIONAIS NO RESÍDUO
DA NICARBAZINA E MONITORAMENTO DO SEU PRODUTO DE
DEGRADAÇÃO NA CARNE DE FRANGO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos, Setor de
Tecnologia, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Igarashi Mafra.
Co-orientadora: Dra. Vivian Feddern.

CURITIBA

2019

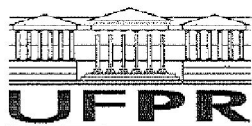
Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

B125e Bacila, Danniele Miranda

Efeito dos tratamentos térmicos convencionais no resíduo da nicarbazina e monitoramento do seu produto de degradação na carne de frango [recurso eletrônico] / Danniele Miranda Bacila, 2019.

Tese (doutorado) – Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos,
Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná
Orientadora: Profa. Dra. Luciana Igarashi Mafra
Co-orientadora: Dra. Vivian Feddern

1. Resíduos químicos. 2. Carne de Ave. 3. Frango. 3. Alimentos –
segurança. 4. Engenharia de Alimentos. I. Universidade Federal do
Paraná. II. Mafra, Luciana Igarashi. III. Feddern, Vivian IV. Título.
CDD 668.6




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6


TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DANNIELE MIRANDA BACILA** intitulada: **Efeito dos Tratamentos Térmicos Convencionais no Resíduo da Nicarbazina e Monitoramento do seu Produto de Degradação na Carne de Frango.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

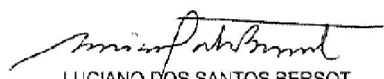
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


CURITIBA, 26 de Abril de 2019.


LUCIANA IGARASHI-MAFRA
Presidente da Banca Examinadora


RICARDO LUIS RADIS STEINMETZ
Avaliador Externo (EMBRAPA)


MARIA LUCIA MASSON
Avaliador Interno (UFPR)


LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Avaliador Externo (UFPR)


FRANCINY CAMPOS SCHMIDT
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me concedido sabedoria e disposição para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Alvaro Platão Elias Bacila (*in memoriam*) e Neiva da Luz Miranda Bacila, pelo amor, exemplo e pela motivação para estudar que me deram ao longo da minha vida.

Ao meu marido, Luiz Valmor dos Santos, pelo companheirismo, incentivo e compreensão, principalmente, nos momentos que estive ausente de casa.

À professora Luciana Igarashi Mafra, orientadora desta tese, pela confiança, orientação, atenção, paciência e imenso apoio direcionados a este trabalho na temática proposta.

À Vivian Feddern, minha co-orientadora, pelos seus direcionamentos, empenho na busca de recursos e parcerias, orientação na elaboração de trabalhos científicos, incentivo na participação de eventos e pelo acolhimento, possibilitando o desenvolvimento da tese em outro Estado.

A Gerson Neudí Scheuermann, por ter acreditado na minha ideia, por ter dado abertura para estabelecer uma parceria, pela disponibilidade na elaboração do projeto MP3 da Embrapa, pois a aprovação do projeto foi pré-requisito para firmar a cooperação técnica, e pela estimável ajuda na execução desta pesquisa.

A Anildo Cunha Junior, pela dedicação intensa ao projeto, apoio técnico, ensinamentos, por partilhar seu amplo conhecimento com tanta paciência, pela ajuda na operacionalização das atividades no laboratório, enfim, pelas contribuições preciosas e fundamentais que ajudaram atingir o objetivo proposto.

À Vanessa Gressler pela ajuda e participação no projeto, principalmente, relativa à análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, e também pelas explicações detalhadas da técnica, bem como suporte no desenvolvimento dos métodos.

A Arlei Coldebella e Luizinho Caron, pelas opiniões, ajuda na solução de problemas e tomada de decisões durante as várias reuniões do grupo.

A Valter Felicio e Valdir Silveira de Avila pelo apoio na execução dos experimentos de campo.

À Helenice Mazzuco por ter disponibilizado o forno elétrico para o experimento dos tratamentos térmicos.

Aos vários membros do Laboratório da Embrapa Suínos e Aves que ajudaram de alguma forma no trabalho.

A Heitor Daguer e Luciano Molognoni, pelo apoio, parceria, troca de ideias, disponibilidade e grande auxílio nas análises cromatográficas realizadas nas dependências do Lanagro.

A Marcelo Lazzarotto, Fabricio Augusto Hansel e Tielidy de Lima pela ajuda na execução das análises térmicas realizadas nos laboratórios da Embrapa Florestas.

À professora Mônica Beatriz Kolicheski, por ajudar na avaliação da cinética da hidrólise.

As bolsistas de iniciação científica, Indianara Weber e Ana Julia que fizeram parte de alguns momentos desta caminhada.

Aos colegas, especialmente do Latos, pela troca de experiências.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite e pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, em especial aos professores do PPGEAL.

À Embrapa Suínos e Aves, pela cooperação técnica firmada com à UFPR, pela infraestrutura e recursos financeiros disponibilizados, os quais foram fundamentais para a execução da tese no tema selecionado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa de iniciação científica concedida (421626/20160).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, bolsa de estudos nº 1533827.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese de doutorado.

Muito obrigada!

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento, e ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.

Marie Curie

RESUMO

O composto 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC) é o resíduo de interesse do anticoccidiano nicarbazina em carne de frango. Apesar de serem encontrados níveis de DNC superiores ao limite máximo de resíduo (LMR) permitido, a carne de frango é consumida após ser processada termicamente. Isso significa que avaliar o impacto de tratamentos térmicos sobre o resíduo DNC pode contribuir para uma estimativa mais precisa dos riscos de exposição do consumidor. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do processamento térmico no conteúdo de DNC acumulado em carne de frango e monitorar o seu produto de degradação. Para isso, foram realizados ensaios de hidrólise de DNC em soluções aquosas a 100 °C em diferentes pH (2–10). Para obtenção do perfil de decomposição térmica da DNC foram utilizadas as técnicas termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial acoplada à espectrometria de massas (TGA-DSC-MS) e pirólise associada a cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Py-GC-MS). A análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi utilizada para quantificação de DNC e do seu produto de degradação em peito de frango. As amostras de peito de frango contendo DNC foram obtidas da criação de frangos de corte com administração de nicarbazina (180 mg kg⁻¹) na ração durante 42 dias. Foram selecionados cinco métodos convencionais de preparo da carne: cozimento em água, grelha, micro-ondas, fritura e forneamento. Os resultados dos ensaios de hidrólise demonstraram que a DNC foi hidrolisada (100 °C) tanto sob catálise ácida quanto básica e resultou na liberação de *p*-nitroanilina (*p*-NA). As análises térmicas revelaram que a decomposição da DNC ocorreu entre 252-280 °C como um evento endotérmico (ΔH de 670 J g⁻¹). Os resultados dos experimentos dos tratamentos térmicos da carne, demonstraram que a degradação máxima foi alcançada em 10 min para cozimento em água, em 30 min para grelha, e em 2 min para micro-ondas. Para estes métodos, nenhuma redução significativa dos níveis de DNC ocorreu acima dos referidos tempos de tratamento térmico. Por outro lado, uma degradação linear foi evidenciada quando fritura e forneamento foram aplicados. No experimento do comparativo dos métodos, o cozimento em água foi o mais eficiente, apresentando 69% de degradação do resíduo. Grelha, micro-ondas, fritura e forneamento apresentaram em média 55% de degradação. Fatores como tempo de tratamento térmico, perda de água e temperatura das amostras exerceram influência na degradação do resíduo DNC. A quantificação de *p*-NA nas amostras de peito de frango contendo DNC processadas termicamente apontou a sua ocorrência. Estes resultados corroboram a liberação de *p*-NA a partir da degradação hidrolítica da DNC. Esta liberação foi mais pronunciada ao longo do tempo de tratamento térmico. A ocorrência de *p*-NA em carne de frango a partir da degradação da DNC não havia sido reportada ainda. Cozimento em água e micro-ondas apresentaram os menores níveis de *p*-NA, enquanto que grelha, fritura e forneamento atingiram 326,3, 640,0 e 456,9 µg kg⁻¹, respectivamente. Sendo assim, é importante que se considere o efeito do processamento térmico na concentração de DNC e *p*-NA em peito de frango. Finalmente, recomenda-se um melhor entendimento sobre os produtos de degradação, uma vez que a partir do composto principal podem ser formados outros compostos de maior toxicidade.

Palavras-chave: Degradação de resíduos. DNC. Anticoccidiano. Peito de Frango. Cozimento.

ABSTRACT

The chemical compound 4,4'-dinitrocarbanilide (DNC) is the residue of concern left from the anticoccidial nicarbazin in chicken meat. Despite being found DNC levels above the maximum residue limits allowed, chicken meat undertakes thermal processing before consumption. This means that to obtain the effect of thermal processing on DNC residue can provide a more accurate food safety risk assessment. This study aimed to evaluate the influence of thermal processing on DNC levels accumulated in chicken meat and to monitor its degradation product. In order to reach this target, DNC hydrolysis assay was carried out in aqueous solutions at 100 °C in different pH (2–10) levels. To obtain DNC thermal behavior, thermal analysis was performed by thermogravimetry and differential scanning calorimetry coupled to mass spectrometry (TGA-DSC-MS) and pyrolysis coupled to gas chromatography and mass spectrometry (Py-GC-MS). Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used for quantification of DNC and its degradation product in chicken meat. Chicken breast samples containing DNC were obtained through a field experiment by feeding broilers with nicarbazin (180 mg kg⁻¹) for 42 days. Five conventional cooking methods were considered: boiling, grilling, microwaving, frying, and roasting. Results from hydrolysis assays showed DNC breakdown (100 °C) in both acid and alkaline medium, releasing *p*-nitroaniline (*p*-NA). Thermal analysis revealed DNC decomposition between 252–280 °C as an endothermic event (ΔH de 670 J g⁻¹). Results from thermal processing of chicken meat containing DNC showed that all cooking methods, over the time, surpassed the endpoint core temperature in chicken breast. Maximum DNC degradation was achieved at 10 min for boiling, at 30 min for grilling, and at 2 min for microwaving. For these methods, no further reduction was evidenced for longer processing time. On the other hand, a continuous linear increase of DNC degradation occurred when frying or roasting were performed. In method comparative experiment, boiling was the most efficient procedure in reducing DNC, promoting 69% of residue degradation. Grilling, microwaving, and frying reached 55% of DNC degradation. Factors such as cooking time, water loss and sample temperature presented influence on DNC degradation. Quantification of *p*-NA in chicken breast samples containing DNC and submitted to thermal processing showed occurrence of this degradation product. These results corroborated release of *p*-NA from DNC hydrolysis. This release was more significant over cooking time and was never reported so far. Boiling and microwaving showed the lowest levels of *p*-NA, whereas grilling, frying and roasting, achieving 326,3, 640,0 and 456,9 µg kg⁻¹, respectively. Therefore, it is important to consider the effect of thermal processing on DNC and *p*-NA content in chicken meat. Finally, it is suggested a better understanding of the degradation products, because even if the parent compound is degraded, other toxic compounds can be formed.

Keywords: Residue degradation. DNC. Anticoccidial. Chicken breast. Cooking.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– FÓRMULA ESTRUTURAL DA NICARBAZINA.....	24
FIGURA 2	– NÃO CONFORMIDADES DO ANTICCODIANO NICARBAZINA DETECTADAS EM CARNE DE FRANGO NO PLANO NACIONAL DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES DO MAPA.....	37
FIGURA 3	– MECANISMOS PARA HIDRÓLISE DE FENILUREIAS EM MEIOS ÁCIDO E ALCALINO.....	39
FIGURA 4	– DIAGRAMA CONCEITUAL DA SEÇÃO DE MATERIAL E MÉTODOS DA TESE.....	43
FIGURA 5	– ETAPAS DA DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO.....	50
FIGURA 6	– ETAPAS DA DETERMINAÇÃO DO ANALITO <i>p</i> -NA EM PEITO DE FRANGO.....	57
FIGURA 7	– POSIÇÕES DE FRACIONAMENTO DO PEITO DE FRANGO.....	66
FIGURA 8	– DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DE DNC COM LIBERAÇÃO DE <i>p</i> -NA.....	71
FIGURA 9	– DIMINUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNC, NA TEMPERATURA DE 100 °C, EM FUNÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE EM DIFERENTES NÍVEIS DE pH.....	72
FIGURA 10	– COMPARATIVO DA DEGRADAÇÃO DE DNC OBTIDA EXPERIMENTALMENTE <i>VERSUS</i> A DEGRADAÇÃO DE DNC CALCULADA CONSIDERANDO O MODELO CINÉTICO DE PSEUDO-PRIMEIRA ORDEM.....	73
FIGURA 11	– HIDRÓLISE DE DNC NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EXTRATO ENZIMÁTICO APÓS 45 MIN DE REAÇÃO.....	74
FIGURA 12	– CURVAS DE TGA-DSC DA DNC E FRAGMENTOS DE MASSAS (<i>m/z</i>) LIBERADOS DURANTE A ANÁLISE TÉRMICA SIMULTÂNEA DE TGA-DSC-MS.....	76

FIGURA 13	– PRODUTOS DA DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DE DNC IDENTIFICADOS PELOS FRAGMENTOS DE MASSAS (m/z) LIBERADOS NA ANÁLISE DE TGA-DSC-MS.....	76
FIGURA 14	– CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS E ESPECTRO DE MASSAS DOS PRODUTOS DA PIRÓLISE DE DNC A 350 °C.....	77
FIGURA 15	– CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DE DNC EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE.....	78
FIGURA 16	– CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE BRANCOS FORTIFICADOS COM DNC OBTIDOS PELO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO ANALITO p -NA.....	81
FIGURA 17	– DEGRADAÇÃO DO RESÍDUO DNC EM AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO E MUDANÇAS DA TEMPERATURA AO LONGO DO TEMPO POR TRATAMENTO TÉRMICO.....	84
FIGURA 18	– TEMPERATURA MÉDIA NO CENTRO GEOMÉTRICO DAS AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO.....	88
FIGURA 19	– EFICIÊNCIA DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS NA DEGRADAÇÃO DO RESÍDUO DNC EM CARNE DE FRANGO.....	88
FIGURA 20	– CROMATOGRAMAS DA ANÁLISE DE p -NA EM AMOTRAS DE PEITO DE FRANGO CONTENDO DNC..	91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ANTICOCCIDIANOS APROVADOS PARA O CONTROLE DE COCCIDIOSE	23
QUADRO 2 – MATERIAIS PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO	50
QUADRO 3 – REAGENTES PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO	51
QUADRO 4 – MATERIAIS PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO <i>p</i> -NA EM PEITO DE FRANGO	58
QUADRO 5 – REAGENTES PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO <i>p</i> -NA EM PEITO DE FRANGO	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA NICARBAZINA.....	25
TABELA 2	– PROPRIEDADES DA 4,4'-DINITROCARBANILIDA (DNC) E 4,6-DIMETIL-HIDROXIPYRIMIDINA (HDP).....	25
TABELA 3	– PERFIL DE TOXICIDADE DA NICARBAZINA.....	26
TABELA 4	– PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA <i>p</i> -NA.....	29
TABELA 5	– PERFIL DE TOXICIDADE DA <i>p</i> -NA.....	29
TABELA 6	– RESUMO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DIÁRIA ACEITÁVEL DE NICARBAZINA E DNC	31
TABELA 7	– DADOS PARA OBTENÇÃO DE LIMITE MÁXIMO DO RESÍDUO DNC EM TECIDOS COMESTÍVEIS DE FRANGO.....	32
TABELA 8	– COMPARATIVO DA INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL E LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO DNC EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE.....	33
TABELA 9	– AVALIAÇÃO DO RESÍDUO DNC EM TECIDOS DE FRANGO DE CORTE.....	35
TABELA 10	– PARÂMETROS PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO POR LC-MS/MS.....	54
TABELA 11	– DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS AO LONGO DO TEMPO.....	65
TABELA 12	– DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS.....	67
TABELA 13	– LINEARIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ) DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO.....	79
TABELA 14	– RECUPERAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO FORTIFICADO USANDO CURVA DE	

	CALIBRAÇÃO NA SOLUÇÃO DA MATRIZ COMBINADA COM PADRÃO INTERNO.....	80
TABELA 15	– LINEARIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ) DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO ANALITO <i>p</i> -NA EM PEITO DE FRANGO.....	82
TABELA 16	– RECUPERAÇÃO DO ANALITO <i>p</i> -NA EM PEITO DE FRANGO FORTIFICADO USANDO CURVA DE CALIBRAÇÃO NA SOLUÇÃO DA MATRIZ COMBINADA COM PADRÃO INTERNO.....	82
TABELA 17	– NÍVEIS DESCRITIVOS DE PROBABILIDADE DO TESTE <i>F</i> DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA A DEGRADAÇÃO DE DNC EM PEITO DE FRANGO AO LONGO DO TEMPO DE TRATAMENTO TÉRMICO	83
TABELA 18	– NÍVEIS DESCRITIVOS DE PROBABILIDADE DO TESTE <i>F</i> DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA A DEGRADAÇÃO DE DNC EM PEITO DE FRANGO SUBMETIDO A TRATAMENTO TÉRMICO.....	87
TABELA 19	– PERDA DE MASSA DAS AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO APÓS PROCESSAMENTO TÉRMICO.....	89
TABELA 20	– ESTUDOS QUE AVALIARAM A DEGRADAÇÃO DE DNC EM PEITO DE FRANGO SUBMETIDO A TRATAMENTO TÉRMICO.....	90
TABELA 21	– LIBERAÇÃO DE <i>p</i> -NA DA CARNE DE FRANGO CONTENDO DNC AO LONGO DO TEMPO DE TRATAMENTO TÉRMICO.....	92
TABELA 22	– NÍVEIS DE <i>p</i> -NA EM CARNE DE FRANGO CONTENDO DNC EM DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS EM UM TEMPO FIXO.....	93

LISTA DE SIGLAS

ABPA	- Associação Brasileira de Proteína Animal
CE	- Collision Energy
CXP	- Collision Cell Exit Potential
DNC	- 4,4'-dinitrocarbanilida
DNC- <i>d</i> ₈	- Dinitrocarbanilida deuterado
DP	- Declustering Potential
EFSA	- European Food Safety Authority
EP	- Entrance Potential
FAO	- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FDA	- Food and Drug Administration
HDP	- 2-hidroxi-4,6-dimetil-pirimidina
IDA	- Ingestão Diária Aceitável
LC-MS/MS	- Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry
LC ₅₀	- Lethal Concentration
LD ₅₀	- Lethal Dose
LMR	- Limite Máximo de Resíduo
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NOAEL	- No Observed Adverse Effect Level
<i>p</i> -NA	- <i>p</i> -nitroanilina
PNCRC	- Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
Py-GC-MS	- Pyrolysis Coupled to Gas Chromatography and Mass Spectrometry
SALLE	- Extração líquido-líquido assistida por salting-out
TGA-DSC-MS	- Termogravimetry and Differential Scanning Calorimetry Coupled to Mass Spectrometry

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVO GERAL	18
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	CARNE DE FRANGO	20
2.2	ADITIVOS AUTORIZADOS NA PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	21
2.2.1	Uso de anticoccidianos na avicultura industrial	22
2.2.2	Nicarbazina	24
2.2.2.1	Toxicidade	26
2.2.2.2	Ingestão diária aceitável	30
2.2.2.3	Limites máximos de resíduos	31
2.3	OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DA NICARBAZINA	33
2.3.1	Tecidos comestíveis de frango	34
2.3.2	Monitoramento de resíduos	36
2.3.3	Estratégias para degradação do resíduo DNC em carne de frango	37
2.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO DE LITERATURA	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	EXPERIMENTOS DA HIDRÓLISE DE DNC	44
3.1.1	Hidrólise ácida e alcalina	44
3.1.2	Hidrólise enzimática	46
3.2	PERFIL DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DA DNC	47
3.3	INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS NO CONTEÚDO DE DNC EM CARNE DE FRANGO	49
3.3.1	Método para determinação de DNC em peito de frango	49
3.3.1.1	Materiais e Reagentes	50
3.3.1.2	Preparo de soluções	51
3.3.1.3	Preparo das amostras	52
3.3.1.4	Extração	53
3.3.1.5	Preparo da curva de calibração na solução da matriz combinada com padrão interno	53
3.3.1.6	Método de quantificação do analito DNC	53
3.3.1.7	Validação do método	55
3.3.2	Método para determinação de <i>p</i> -NA em peito de frango	56
3.3.2.1	Materiais e Reagentes	58

3.3.2.2	Preparo de soluções.....	59
3.3.2.3	Preparo das amostras	60
3.3.2.4	Extração	60
3.3.2.5	Extração líquido-líquido assistida por <i>salting-out</i> e derivatização	60
3.3.2.6	Preparo da curva de calibração na solução da matriz combinada com padrão interno	61
3.3.2.7	Método de quantificação do analito <i>p</i> -NA por LC-MS/MS	61
3.3.2.8	Detecção de <i>p</i> -NA em água de cozimento do peito de frango	62
3.3.2.9	Validação do método.....	63
3.3.3	Obtenção das amostras de peito de frango contendo DNC	64
3.3.4	Tratamentos térmicos.....	65
3.3.4.1	Experimento 1	65
3.3.4.2	Experimento 2	66
3.3.4.3	Aplicação dos tratamentos térmicos em carne de frango contendo DNC	67
3.3.4.4	Determinação dos analitos DNC e <i>p</i> -NA	69
3.3.5	Degradação do resíduo DNC	69
3.3.6	Análise Estatística	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	EXPERIMENTOS DA HIDRÓLISE DE DNC	71
4.1.1	Hidrólise ácida e alcalina.....	71
4.1.2	Hidrólise enzimática	74
4.2	PERFIL DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DA DNC.....	75
4.3	INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS NO CONTEÚDO DE DNC EM CARNE DE FRANGO.....	80
4.3.1	Parâmetros de desempenho do método analítico	80
4.3.2	Efeito dos tratamentos térmicos no conteúdo de DNC em carne de frango	84
4.3.3	Eficiência dos tratamentos térmicos na degradação de DNC em carne de frango	88
4.3.4	Liberação de <i>p</i> -NA em peito de frango contendo DNC	91
4.4	RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS	95
5	CONCLUSÃO	98
	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	99
	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	100
	REFERÊNCIAS	102
	APÊNDICE 1 – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUA) DA EMBRAPA SUÍNOS E AVES PARA A CRIAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	112

APÊNDICE 2 – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE BIOSSEGURIDADE (COMBIO) DA EMBRAPA SUÍNOS E AVES PARA A CRIAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	116
APÊNDICE 3 – COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES POR FASE DE CRIAÇÃO DOS FRANGOS DE CORTE.....	119
APÊNDICE 4 – AUTORIZAÇÃO PARA USO DE RESULTADOS DA TESE PUBLICADOS EM PERIÓDICOS	120
APÊNDICE 5 – RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE (QC) PARA O ANALITO DNC NA MATRIZ PEITO DE FRANGO	123
APÊNDICE 6 – RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE (QC) PARA O ANALITO <i>p</i> -NA NA MATRIZ PEITO DE FRANGO	125

1 INTRODUÇÃO

A elevada demanda por proteína de origem animal faz a produção de frangos de corte crescer em um ritmo contínuo. O Brasil é um grande produtor e líder em exportações de carne de frango. (ABPA, 2018). Para atender a demanda de produtos cárneos de aves, o sistema de produção avícola emprega aditivos na ração a fim de evitar enfermidades na ave e promover o ganho de peso otimizado do animal. Isso torna o processo de produção de frangos de corte mais eficiente e menos oneroso. Uma das classes de compostos empregados para este fim é a de anticoccidianos, os quais combatem uma doença infecciosa comum na criação de aves, a coccidiose.

A nicarbazina é um anticoccidiano, empregado como aditivo na alimentação animal, sendo amplamente utilizado para prevenir a coccidiose em frangos. Este composto apresenta bom custo-benefício, contribuindo com o contínuo fornecimento de proteína de alta qualidade e a baixo custo para o mercado nacional. Além disso, favorece à competitividade da produção brasileira de frangos de corte, frente ao mercado internacional.

A principal preocupação relacionada ao uso da nicarbazina em aves é a presença de resíduos na carne ou nos miúdos comestíveis. No Brasil, o limite máximo de resíduos (LMR) de nicarbazina, expresso em termos do seu composto ativo 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC), para a carne *in natura*, é de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de tecido, seguindo o mesmo limite estabelecido no *Codex Alimentarius*. Embora diversos países considerem suficiente o período de retirada do produto da ração, antes do abate, para não exceder os LMR, contaminações com o resíduo DNC têm sido relatadas. No Brasil, há registros de não conformidades para carne de frango no monitoramento de resíduos conduzido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Uma vez que a principal preocupação é a segurança do consumidor, torna-se imprescindível o controle de resíduos na carne. Como a carne de frango é consumida após algum processamento térmico, é importante levar em consideração o efeito dos diferentes tratamentos térmicos sobre a concentração de DNC e a formação de produtos de degradação. Isso significa que avaliar o impacto de tratamentos térmicos sobre o componente DNC na carne pode

contribuir para uma estimativa mais precisa dos riscos de exposição do consumidor ao resíduo químico.

É fundamental que o efeito do tratamento térmico seja avaliado com tecido cárneo contaminado naturalmente durante o processo de criação da ave. Uma das propostas contempladas neste estudo, é a condução do experimento de modo que ocorram as reações bioquímicas relacionadas ao metabolismo do frango, possibilitando a obtenção de tecidos que replicam as condições mais próximas da realidade da avicultura comercial. O tratamento térmico, por meio de métodos convencionais de preparo, é uma alternativa com potencial para minimizar a quantidade de resíduos químicos na carne. No entanto, a literatura sobre o tema é escassa e relativamente antiga. A última pesquisa relacionada ao tratamento térmico de tecidos de aves contendo nicarbazina foi realizada há mais de 14 anos, porém não considerou o monitoramento da temperatura na carne durante a aplicação do processamento térmico e não conduziu a verificação da ocorrência de produtos de degradação do resíduo.

1.1 OBJETIVO GERAL

Com base no que foi exposto, o objetivo geral desta tese foi avaliar o efeito do processamento térmico no conteúdo de DNC acumulado em carne de frango e realizar o monitoramento do seu produto de degradação.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- avaliar a hidrólise do composto DNC em soluções aquosas e na presença de enzimas pelo monitoramento da *p*-NA para posterior investigação deste produto de degradação na carne de frango;
- obter o perfil de decomposição térmica da DNC para avaliar os principais eventos térmicos envolvidos na sua degradação;
- desenvolver e/ou adaptar metodologias analíticas para a matriz carne de frango, visando a determinação de DNC e do seu produto de degradação;

- investigar se os tratamentos térmicos convencionais promovem a degradação de DNC em carne de frango;
- verificar a ocorrência de produtos de degradação de DNC após a aplicação de tratamentos térmicos na carne.

A tese está organizada em 5 capítulos. O primeiro capítulo constitui a introdução. O capítulo 2 contempla a revisão de literatura, na qual são apresentadas características da carne de frango e dados da produção nacional e internacional de frangos de corte. Esta seção engloba o uso de aditivos na avicultura comercial, com destaque para os anticoccidianos, definindo o que é a coccidiose, seus impactos na produção de frangos de corte e como realizar a sua prevenção. No decorrer deste capítulo, o aditivo químico nicarbazina é apresentado, seu perfil toxicológico e ingestão diária aceitável, bem como limite máximo de resíduos estabelecidos em legislações. No final da revisão de literatura, as ocorrências de resíduos de DNC em carne de frango são relatadas, sendo seccionadas nos itens: tecidos comestíveis de frango, monitoramento de resíduos e estratégias para sua redução, considerando a aplicação de processamento térmico da carne. O fechamento do capítulo é realizado com as principais considerações sobre a revisão de literatura apresentada. No capítulo 3, os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento da pesquisa são detalhados. Este capítulo foi dividido em três seções de acordo com os diferentes tipos de experimentos conduzidos neste estudo: hidrólise de DNC em soluções aquosas; perfil da decomposição térmica da DNC; e influência dos tratamentos térmicos no conteúdo de DNC em carne de frango. No capítulo 4 são apresentados os principais resultados e discussões. O capítulo 5 constitui a conclusão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo encontra-se dividido em quatro tópicos principais. O primeiro contempla características da carne de frango e apresenta dados do mercado a nível nacional e internacional. No segundo tópico, aborda-se os aditivos empregados na produção de frangos de corte, com destaque para o uso de anticoccidianos na avicultura industrial. No final desta parte, apresenta-se um dos principais anticoccidianos, a nicarbazina, seu perfil toxicológico, ingestão diária aceitável e limites máximos de resíduos estabelecidos em legislações. O terceiro tópico da revisão de literatura trata da ocorrência de resíduos de DNC em tecidos comestíveis de frango, por meio de resultados de monitoramento de resíduos, e as estratégias para sua redução. O capítulo finaliza com as principais considerações sobre a revisão de literatura apresentada.

2.1 CARNE DE FRANGO

A carne de frango é amplamente apreciada, com um consumo notório em diversos países, sendo considerada uma fonte de proteína de alta qualidade, além de possuir vitaminas e minerais. A carne de frango tem em sua composição aproximadamente 75% de água, 20% de proteína, 3% de gordura e 2% de substâncias solúveis não proteicas. (TORNBERG, 2005; LAWRIE; LEDWARD, 2006; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O Brasil destaca-se no cenário mundial de produção e exportação de carne de frango. Atualmente, ocupa posição de segundo maior produtor de frangos de corte, depois dos Estados Unidos. Com relação à exportação, possui a liderança no *ranking* mundial, seguido dos Estados Unidos e União Europeia. (ABPA, 2018; USDA, 2018).

A produção brasileira de carne de frango foi de 13,05 milhões de toneladas em 2017, sendo o Paraná o principal produtor, seguido de Santa Catarina, colaborando com 34,32% e 16,21% do total nacional produzido, respectivamente. Neste mesmo ano, o consumo de carne de frango *per capita* foi de aproximadamente 42 kg. (ABPA, 2018).

Estima-se que em 50 anos a população mundial crescerá significativamente e será necessária a produção adicional de alimentos. A

produção brasileira de carne de frango tende a crescer anualmente. (SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014; BRASIL, 2015d).

Com relação à exportação, em 2017, o Brasil exportou 4,32 milhões de toneladas de carne de frango, gerando uma receita de US\$ 7,2 milhões. Atualmente os Estados que mais exportam são Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. (ABPA, 2018).

2.2 ADITIVOS AUTORIZADOS NA PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

No sistema de produção avícola intensivo, as aves compartilham a mesma ração, água e o ar ambiente. Caso a ave apresente alguma enfermidade nesse meio, há um risco elevado da transmissão aos demais. As consequências da propagação destas doenças são graves no que diz respeito à sanidade animal, à rentabilidade do agronegócio e principalmente, à qualidade do alimento gerado. Neste contexto, emerge a necessidade do tratamento de todos os animais de maneira preventiva, tornando comum o uso de medicamentos profiláticos e/ou aditivos na ração ou na água. Estes podem agir como agentes melhoradores do desempenho, apresentando a capacidade de promover o ganho de peso, causando impactos positivos na produtividade. (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2009; SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014). A criação de frangos de corte sem a utilização destes compostos pode impactar negativamente na eficiência e viabilidade do processo. (CERVANTES, 2015).

Os aditivos destinados à alimentação animal são definidos na Instrução Normativa 44/2015 do MAPA como:

Substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais. (BRASIL, 2015b, p.1).

As categorias destes aditivos foram estabelecidas de acordo com as suas funções e propriedades, sendo eles classificados como aditivos: tecnológicos, sensoriais, nutricionais, zootécnicos e anticoccidianos. Estes últimos são considerados compostos que promovem a prevenção ou tratamento da coccidiose. (BRASIL, 2004b; BRASIL, 2015b; BRASIL, 2018).

2.2.1 Uso de anticoccidianos na avicultura industrial

A avicultura industrial atravessou uma série de desafios para o seu desenvolvimento, tendo fases reconhecidas como marcos históricos da evolução do sistema produtivo. Entre os eventos mais relevantes, a eficácia da contenção da coccidiose aviária e toda pesquisa desenvolvida e em desenvolvimento para alcançar tal objetivo, tem papel fundamental no progresso da avicultura, estando também associada a melhorias genéticas e nutricionais. (CHAPMAN, 2014).

A coccidiose é uma doença comum e de grande importância econômica na criação de aves de corte. Perdas econômicas anuais de US\$ 3 bilhões são estimadas mundialmente devido a esta enfermidade. (BLAKE; TOMLEY, 2014).

O termo coccidiose compreende um amplo conjunto de danos ocasionados no intestino das aves por protozoários do gênero *Eimeria* spp. Os parasitas comprometem o processo de absorção de nutrientes e a conversão alimentar, afetando o desenvolvimento da ave. Além disso, a coccidiose permite a ocorrência de outras doenças oportunistas devido às lesões geradas no intestino. (DORNE et al., 2013; SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014).

As substâncias químicas que atuam especificamente na prevenção e combate à coccidiose são denominadas de anticoccidianos conforme o modo de ação: coccidiostáticos (geram inibição do crescimento do eimerídio) e coccidicidas (ocasionam interrupção do ciclo de vida e promovem a destruição do parasita). O uso de anticoccidianos é considerado necessário na manutenção da saúde e do bem-estar animal, além de evitar perdas significativas das aves do plantel. Os anticoccidianos geralmente são classificados em: sintéticos (nicarbazina, diclazurila, robenidina, clopidol, halofuginona, diclazuril) e ionóforos (narasina, lasalocida, monensina, maduramicina, senduramicina, salinomicina). Enquanto os anticoccidianos sintéticos são obtidos por meio de reações químicas, os ionóforos são produzidos por diferentes bactérias da família Streptomyetaceae (CLARKE et al. 2014). Estes produtos recebem licença de uso para uma determinada concentração e durante um período de tempo pré-estabelecido. (SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014; CLARKE et al. 2014).

Muitos produtos estão disponíveis no mercado, podendo ser empregados, em diferentes fases do ciclo de vida das aves, isoladamente ou

combinados em misturas. (SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014). Os anticoccidianos aprovados para uso no Brasil, Estados Unidos e na União Europeia estão apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1 – ANTICOCCIDIANOS APROVADOS PARA O CONTROLE DE COCCIDIOSE

Anticoccidiano	Estados Unidos	União Europeia	Brasil
Sintéticos			
Amprólio	Sim	Não	Sim*
Amprólio + etopabato	Sim	Não	Sim
Arprinocida	Não	Sim	Não
Clopidol	Sim	Não	Sim
Clopidol + metilbenzoquato	Não	Não	Sim
Decoquinato	Sim	Sim	Sim
Diclazurila	Sim	Sim	Sim
Halofuginona	Sim	Sim	Sim
Nequinato	Sim	Não	Não
Nicarbazina	Sim	Sim [#]	Sim
Robenidina	Sim	Não	Sim
Zoalene	Sim	Não	Não
Ionóforos poliéteres e associações			
Lasalocida	Sim	Sim	Sim*
Maduramicina	Sim	Sim	Sim
Maduramicina + nicarbazina	Não	Não	Sim
Monensina	Sim	Sim	Sim
Monensina + ácido 3-nitro	Não	Não	Sim
Narasina	Sim	Sim [#]	Sim
Narasina + nicarbazina	Sim	Sim [#]	Sim
Salinomicina	Sim	Sim	Sim
Salinomicina + ácido 3-nitro	Não	Não	Sim
Senduramicina	Sim	Sim	Sim
Senduramicina + nicarbazina	Não	Não	Sim

FONTE: Adaptado de SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK (2014).

Atualizado de [#]UNIÃO EUROPEIA (2010a,b); *BRASIL (2019); [#]UNIÃO EUROPEIA (2016).

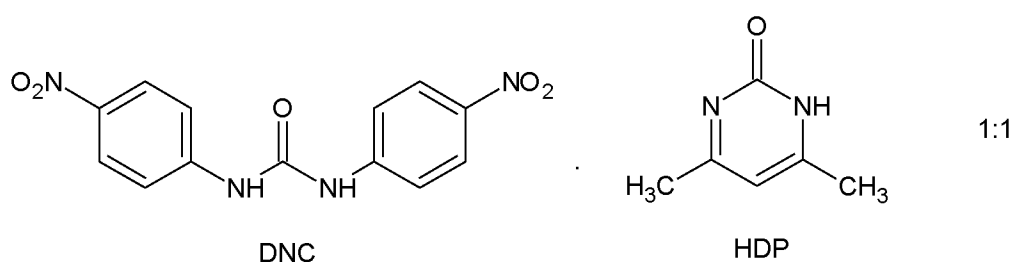
Existem várias formas de utilizar os anticoccidianos na prevenção da coccidiose aviária, ou seja, diferentes programas de controle. Geralmente, o processo inicia logo após o alojamento da ave, encerrando no 38º dia. Dependendo da forma com que estes programas são conduzidos, é possível obter uma eliminação mais eficaz dos resíduos de anticoccidianos nos tecidos

comestíveis obtidos. Os programas de controle mais empregados são chamados de contínuo e duplo. No caso do primeiro, o anticoccidiano é utilizado continuamente na ração, com períodos de retirada que variam de 0 a 10 dias. O programa duplo, mais adotado atualmente, utiliza um aditivo na ração na 1ª fase (até o 21º dia) e outro aditivo na 2ª fase (do 22º dia de idade até o 38º). (SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014).

2.2.2 Nicarbazina

Em 1955, a nicarbazina foi sintetizada, fórmula química $C_{19}H_{18}N_6O_6$, sendo obtida, à temperatura ambiente, por meio de agitação de uma suspensão de 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC) em uma solução de metanol de um equivalente molar de 2-hidroxi-4,6-dimetil-pirimidina (HDP) ou no excesso deste. A reação é finalizada em um tempo de 30 minutos, pela mudança da fase sólida, formando cristais de coloração bege. O complexo equimolar, apresentado na Figura 1, é estabilizado por ligações de hidrogênio. (ROGERS et al., 1983; EFSA, 2003). As moléculas de DNC e HDP também são conhecidas como N,N'-bis (4-nitrofenil) ureia e 4,6-dimetil-2 (1H) pirimidinona, respectivamente. (FAO; WHO, 1999).

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA NICARBAZINA



FONTE: ACD/LABS (2018).

As propriedades físico-químicas da nicarbazina estão apresentadas na Tabela 1, enquanto que as características dos seus componentes DNC e HDP constam na Tabela 2. (EFSA, 2003; EPA, 2005).

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA NICARBAZINA

Propriedade	Descrição
Massa Molar	426,38 g mol ⁻¹
Cor	Amarelo claro
Estado físico	Pó fino
Ponto de Fusão	265 - 275 °C (com decomposição)
Odor	Característico
Estabilidade a temperaturas normais e elevadas	Estável em condições extremas
Absorção máxima UV/VIS	300 – 360 nm
Solubilidade aquosa	Levemente solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF); insolúvel em água e metanol, no entanto se decompõe vagarosamente quando misturado com eles
pH	5 - 7
Pressão de Vapor	O valor esperado à temperatura ambiente é zero
Densidade	0,5 g mL ⁻¹
¹ LogKow	3,76

FONTE: Adaptado de EPA (2005); U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2016).

NOTA: ¹Log Kow: coeficiente de partição em n-octanol/água.

TABELA 2 – PROPRIEDADES DA 4,4'-DINITROCARBANILIDA (DNC) E 4,6-DIMETIL-HIDROXIPYRIMIDINA (HDP)

Propriedade	DNC	HDP
Massa Molar	302 g mol ⁻¹	124 g mol ⁻¹
Solubilidade em água	< 0,02 mg L ⁻¹	Aproximadamente 70 g L ⁻¹
Log Kow	3,6 a pH 5-9	-0,94 a pH 5-9

FONTE: Adaptado de EFSA (2003).

A nicarbazina apresenta uma atividade anticoccidiana eficaz, promovendo controle adequado da coccidiose. O componente ativo é o DNC, enquanto que o HDP aumenta a sua absorção. A eficácia do complexo é maior do que o uso de DNC de forma isolada. Até o momento, desde a disponibilização da nicarbazina em 1955, não foram registrados índices de resistência que pudessem gerar comprometimento dos programas de controle da coccidiose. (ROGERS et al., 1983; EFSA, 2003; SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014). Este anticoccidiano possui uma ação tanto coccidiostática quanto coccidicida (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2009), sendo amplamente utilizado atualmente. (CHAPMAN, 2014; SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014).

Para uso da nicarbazina em ração de frangos de corte, deve-se considerar a lista de fabricantes publicada pelo MAPA. Conforme procedimentos de liberação e registro deste anticoccidiano, tanto a dosagem recomendada quanto o período de carência constam no relatório técnico do produto. No caso da nicarbazina, a concentração recomendada é de 125 mg kg⁻¹ de ração, com o período de retirada do anticoccidiano da ração de 10 dias antes do abate. (SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014; BRASIL, 2019).

2.2.2.1 Toxicidade

As reações tóxicas geradas por anticoccidianos acontecem em diferentes espécies de animais, inclusive em aves de corte, dependendo dos níveis administrados. Quantidades de nicarbazina acima de 125 mg kg⁻¹ de ração podem ocasionar intoxicações em aves, afetando principalmente os mecanismos termorreguladores, consequentemente, seu uso, geralmente, é restrito ao período inicial (fase de crescimento), uma vez que pode aumentar os efeitos do estresse ao calor em fases posteriores, levando a mortalidade. (SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014). O perfil de toxicidade da nicarbazina para diferentes espécies de mamíferos, estabelecido pela FAO e OMS, é apresentado na Tabela 3. (FAO; OMS, 1999; EPA, 2005).

TABELA 3 – PERFIL DE TOXICIDADE DA NICARBAZINA

(continua)

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade oral aguda – rato	LD ₅₀ ¹ > 25.000 mg kg _{m.c.} ⁻¹
Toxicidade de inalação aguda – rato	LC ₅₀ ² > 0,147 mg L ⁻¹
Toxicidade dérmica aguda – rato	LD ₅₀ > 5.000 mg kg _{m.c.} ⁻¹
Irritação ocular primária - coelho	Irritação moderada
Irritação dérmica primária - coelho	Nenhuma irritação
Sensibilização dérmica – porco-da-índia	Não causa sensibilização pelo contato

FONTE: Adaptado de EPA (2005).

NOTAS: ¹ LD₅₀: Dose Letal Média. Uma dose única que pode causar mortalidade de 50% dos animais avaliados. Parâmetro normalizado de acordo com a massa corpórea (m.c.), podendo ser expresso na unidade de mg por kg de massa corpórea (mg kg_{m.c.}⁻¹).

² LC₅₀: Concentração Letal Média. Uma concentração derivada estatisticamente de um composto que pode causar a mortalidade de 50% dos animais avaliados. Parâmetro normalizado de acordo com o ambiente onde os organismos estão expostos.

³ NOAEL: Nível sem efeito adverso observado. Maior dose de uma substância sem efeito adverso estatisticamente significativo nas condições adotadas para o teste.

(conclusão)	
Tipo de Estudo	Resultados
Alimentação crônica, 2 anos - cachorro	NOAEL ³ 240 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Alimentação crônica, 2 anos - rato	NOAEL 400 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Toxicidade reprodutiva - rato	NOAEL 400 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Toxicidade de desenvolvimento - rato	NOAEL 200 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹ para toxicidade materna e fetal
Mutagenicidade	Não é mutagênico
Carcinogenicidade	Não é carcinogênico

FONTE: Adaptado de EPA (2005).

NOTAS: ¹ LD₅₀: Dose Letal Média. Uma dose única que pode causar mortalidade de 50% dos animais avaliados. Parâmetro normalizado de acordo com a massa corpórea (m.c.), podendo ser expresso na unidade de mg por kg de massa corpórea (mg kg_{m.c.}⁻¹).

² LC₅₀: Concentração Letal Média. Uma concentração derivada estatisticamente de um composto que pode causar a mortalidade de 50% dos animais avaliados. Parâmetro normalizado de acordo com o ambiente onde os organismos estão expostos.

³ NOAEL: Nível sem efeito adverso observado. Maior dose de uma substância sem efeito adverso estatisticamente significativo nas condições adotadas para o teste.

A Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos (EFSA), com base nestes dados e em outros estudos avaliados, concluiu que a nicarbazina possui baixa toxicidade aguda. Para avaliar a toxicidade oral subcrônica foi realizado estudo de 3 meses em ratos. Foram selecionados 30 ratos, sendo 15 machos e 15 fêmeas para os quais foram realizados três tratamentos, nas doses diárias de nicarbazina de 200, 600 e 1000 mg por kg de massa corpórea (mg kg_{m.c.}⁻¹). Com base na massa corpórea e consumo de alimentos, as doses de nicarbazina foram mantidas, ajustando a concentração, semanalmente. Após a primeira semana, ocorreu a diminuição da ingestão de alimentos e consequentemente da massa corporal dos ratos, levando ao ajuste das concentrações intermediária e da mais elevada para 400 e 600 mg kg_{m.c.}⁻¹, respectivamente. Desta forma, as concentrações médias finais (diárias) para os machos ficaram 181, 384 e 599 mg kg_{m.c.}⁻¹ e para as fêmeas em 189, 400 e 619 mg kg_{m.c.}⁻¹. Com relação aos resultados, para a concentração de 400 e 600, nos dias 88 e 90, dois machos foram encontrados mortos. No tratamento de concentração mais elevada, um macho morreu no dia 11 e duas fêmeas morreram no dia 85. Os efeitos observados em todos os grupos avaliados nestes diferentes tratamentos foram: perda de peso, alterações em diversos órgãos, com destaque para o rim, o qual apresentou degeneração, inflamação e fibrose. (EFSA, 2010a).

No caso de estudos para avaliação da toxicidade oral, conduzidos em ratos e cachorros, em um período de 2 anos, cães apresentaram um aumento da concentração de serum alanina aminotransferase (serum ALT), o que implica em anormalidades hepáticas. A maior dose em que a substância não possui efeito adverso com significância estatística, nos animais avaliados, nas condições testadas, é denominado de NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*). Neste estudo, o NOAEL foi estabelecido em 154 mg de DNC e em 51 mg de HDP $\text{kg}_{\text{m.c.}}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. (EFSA, 2003; EFSA, 2010a).

Em outro estudo, cães foram alimentados com nicarbazina durante 2 anos em diferentes tratamentos e concentrações de DNC e HDP e foi evidenciado o aumento do serum ALT em muitos dos animais testados, além da proliferação do ducto biliar. Em consequência, um NOEL para nicarbazina de 240 mg $\text{kg}_{\text{m.c.}}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ foi estabelecido. (FAO; OMS, 1999).

A toxicidade de desenvolvimento foi avaliada por meio de estudo conduzido em ratos. As quantidades de nicarbazina dadas aos animais diariamente foram de 0, 70, 200 ou 600 mg $\text{kg}_{\text{m.c.}}^{-1}$, sendo administradas por gavagem, durante a gestação, nos dias 7-17. Para a concentração mais alta de nicarbazina, foi observada perda de peso materna e das 25 fêmeas avaliadas, 7 morreram. Nesta concentração, devido as anormalidades observadas no feto, como ossificação atrasada e baixo peso, dentre outros, foi constatado que o seu desenvolvimento foi afetado. Com base nesta avaliação, obteve-se um NOAEL de 200 mg $\text{kg}_{\text{m.c.}}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para toxicidade materna e fetal. (FAO; OMS, 1999).

Com relação a mutagenicidade, uma pesquisa apontou genotoxicidade da nicarbazina para duas espécies de *Salmonella*, no entanto, como testes *in vivo* em mamíferos apresentaram ausência deste efeito, a nicarbazina foi considerada sem risco genotóxico. (EFSA, 2010a).

Na síntese de DNC, ocorre a formação da *p*-nitroanilina (*p*-NA), que é uma impureza inerente ao processo da sua obtenção. Com base em avaliações de genotoxicidade e de carcinogenicidade, a EFSA recomendou o máximo de 0,1 % de *p*-NA na nicarbazina a ser utilizada na ração. (EFSA, 2010a).

Esta anilina pertence à classe das aminas aromáticas, substâncias com potencial carcinogênico (BENIGNI; ASSERINI, 2002). As propriedades tóxicas da *p*-NA podem ser atribuídas aos seus grupos funcionais. Como uma amina aromática, pode sofrer oxidação e como um composto nitrogenado aromático,

pode ser reduzido. Desta forma, derivados nitrosos e hidroxilaminas podem ser formados (DFG, 2014). Com relação às avaliações de toxicidade, estudos reportaram que em determinadas concentrações, a *p*-NA pode ocasionar problemas no fígado e atuar como indutor de meta-hemoglobinemia, uma doença que pode reduzir os níveis de oxigênio no sangue. (NAIR et al., 1990; NTP, 1993). As propriedades físico-químicas e informações toxicológicas da *p*-NA estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 4 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA *p*-NA

Propriedade	Descrição
Massa Molar	138,13 g mol ⁻¹
Cor	Amarelo claro
Estado físico	Pó fino
Ponto de fusão	146 °C
Ponto de ebulição	332 °C
Solubilidade	Solúvel em água (0,8 g L ⁻¹), benzeno e metanol

FONTE: BUDAVARI (1996).

TABELA 5 – PERFIL DE TOXICIDADE DA *p*-NA

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade oral aguda – ratos	LD ₅₀ ¹ > 750 mg kg _{m.c.} ⁻¹
Toxicidade oral subcrônica - ratos (2 semanas)	LOAEL ² 10 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Toxicidade oral subcrônica - ratos (90 dias)	LOAEL 3 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Toxicidade oral subcrônica - ratos (7 e 13 semanas)	NOAEL ³ 3 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Toxicidade oral crônica – ratos (9 e 15 meses)	LOAEL 3 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Toxicidade oral crônica – ratos (2 anos)	LOAEL 1,5 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹ NOAEL 0,25 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Toxicidade de desenvolvimento - coelhos	NOAEL 85 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹ para toxicidade materna e fetal
Toxicidade reprodutiva - ratos	NOAEL 9 mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹
Mutagenicidade	Atividade mutagênica <i>in vitro</i>
Carcinogenicidade	Potencial carcinogênico

FONTE: EPA (2009), EFSA (2010a), U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2019).

NOTAS: ¹ LD₅₀: Dose Letal Média. Uma dose única que pode causar mortalidade de 50% dos animais avaliados. Parâmetro normalizado de acordo com a massa corpórea (m.c.), podendo ser expresso na unidade de mg por kg de massa corpórea (mg kg_{m.c.}⁻¹).

² LOAEL: Menor concentração de um composto que causa efeito adverso estatisticamente significativo nos organismos testados e nas condições adotadas do ensaio.

³ NOAEL: Nível sem efeito adverso observado. Maior dose de uma substância sem efeito adverso estatisticamente significativo nas condições adotadas para o teste.

2.2.2.2 Ingestão diária aceitável

As informações toxicológicas servem como base para o estabelecimento dos valores de ingestão diária aceitável (IDA) para humanos. A IDA é derivada dos valores de NOAEL com a aplicação de um fator de segurança, conforme a equação (1). O NOAEL, entendido como a maior dose de um composto químico que não gera efeitos adversos, é obtido experimentalmente por meio de ensaios realizados em pelo menos três espécies animais, sendo o valor extrapolado para a espécie humana. Para isso, se adota um fator de segurança (FS) que aumenta a proteção para o ser humano, considerando que este tenha sensibilidade em até 10 vezes superior ao valor das espécies testadas. (REVOLLEDO; FERREIRA, 2005; DORNE et al., 2013).

$$IDA = \frac{NOAEL}{FS} \quad (1)$$

A IDA de nicarbazina que consta no *Codex Alimentarius*, sendo expressa no seu componente DNC, é de até 0,40 mg kg_{m.c.}⁻¹ (equivalente a 24 mg de DNC para uma pessoa de 60 kg). Esta IDA baseia-se no valor de NOAEL da nicarbazina de 200 mg kg_{m.c.}⁻¹ dia⁻¹, obtido da avaliação de toxicidade de desenvolvimento em ratos. O fator de segurança aplicado foi de 500, devido às limitações dos dados disponíveis. (FAO; OMS, 1999; FAO; OMS, 2018).

No caso da EFSA, foi estabelecido o valor de 0,77 mg kg_{m.c.}⁻¹ como máxima ingestão diária para o componente DNC da nicarbazina (valor equivalente a 46 mg de DNC, para uma pessoa de 60 kg). Obteve-se esta IDA tendo como base um estudo mais recente, conduzido por 2 anos em cachorros, o qual apresentou um NOAEL de 154 mg DNC kg_{m.c.}⁻¹ dia⁻¹, sendo diferente da FAO/OMS, pois foi expresso no componente DNC e não em termos de nicarbazina. O painel da EFSA afirma que a obtenção do índice deve ser conduzida desta forma, pois o consumidor estará exposto à molécula de DNC e não ao complexo nicarbazina (DNC e HDP). (EFSA, 2010a). A Tabela 6 possui um comparativo entre IDAs da nicarbazina e do seu componente DNC.

TABELA 6 – RESUMO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DE INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL DE NICARBAZINA E DNC

Composto	NOEL (mg kg _{m.c.} ⁻¹ dia ⁻¹)	Efeitos observados	Espécies/Estudo	FS	IDA (mg kg ⁻¹)
Nicarbazina	200	Toxicidade maternal (mortalidade e perda de peso) e anormalidades no feto (baixo peso e ossificação atrasada)	Ratos/ Toxicidade de Desenvolvimento	500	0,40
DNC	154	Aumento de serum alanina aminotransferase	Cães/ 2 anos	200	0,77

FONTE: Adaptado de BACILA, D. M. et al. Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. **Food Research International**, n. 99, p. 31–40, 2017.

2.2.2.3 Limites máximos de resíduos

O limite máximo de resíduo (LMR) é “a concentração máxima permitida do resíduo de um produto de uso veterinário no alimento de origem animal, que é legalmente permitida ou reconhecida como segura à saúde do consumidor”. (BRASIL, 2009, p. 2).

A utilização de determinados produtos na avicultura comercial pode gerar a presença de resíduos em alimentos. Para evitar riscos à saúde dos consumidores e não extrapolar os valores de ingestão diários recomendados, as autoridades regulamentaram o uso de produtos empregados na prevenção e no tratamento de doenças de animais de produção, fixando os LMRs destes produtos em alimentos, além de proibir a utilização de certos compostos. (PIZARRO; FERREIRA, 2014). Em suma, são estabelecidos os LMRs em alimentos de origem animal para que a IDA possa ser atendida e para que sejam minimizados os riscos à saúde dos consumidores. (DORNE et al., 2013).

O componente DNC da nicarbazina é reconhecido como o resíduo marcador em tecidos de frango, com base em experimentos *in vivo* com frangos alimentados com nicarbazina. Ao comparar as quantidades de resíduos depositadas nos tecidos, a ordem de magnitude dos resíduos de DNC foi muito superior aos demais. (FAO; OMS, 1999; EFSA, 2010a).

O comitê especializado em aditivos alimentares da FAO/OMS recomenda o LMR para a nicarbazina, expresso como seu resíduo marcador, em tecidos de frango de corte, com base nas quantidades estimadas que constam

na Tabela 7. Os percentuais de resíduos são oriundos de estudo conduzido em frangos para avaliar a depleção de resíduos. O resíduo DNC, contabilizou 90% dos resíduos totais de nicarbazina na pele com gordura aderida, 65% na carne, 45% no fígado e 15% no rim. Para a obtenção da ingestão teórica máxima de resíduos, foi considerada uma ingestão diária de 50 g de rim, 50 g de gordura, 100 g de fígado e 300 g de carne de frango. (FAO; OMS, 1999).

Na União Europeia, por meio do Regulamento 875/2010, foram instituídos diferentes limites para o resíduo DNC, sendo 15 mg kg⁻¹ para fígado, 6 mg kg⁻¹ para rim e 4 mg kg⁻¹ para carne e pele/gordura. Os valores dos quais estes limites derivaram estão contemplados na Tabela 7. A forma de obtenção destes LMRs parte da exposição diária do consumidor a resíduos da nicarbazina, considerando o consumo dos produtos derivados do frango e o cálculo de resíduos totais. (UNIÃO EUROPEIA, 2010a).

TABELA 7 – DADOS PARA OBTENÇÃO DE LIMITE MÁXIMO DO RESÍDUO DNC EM TECIDOS COMESTÍVEIS DE FRANGO

FAO/OMS					
	Fígado	Rim	Carne	Pele/ gordura	Soma
LMR recomendado (µg kg ⁻¹ de tecido)	200	200	200	200	
Resíduo marcador em relação aos resíduos totais (%)	45	15	65	90	
Estimativa de resíduos totais (µg kg ⁻¹)	444	1 333	308	222	
Consumo diário (g)	100	50	300	50	500
Ingestão diária teórica máxima de resíduos totais (µg)	44	67	92	11	214
Consumo (% IDA)					0,9
EFSA					
	Fígado	Rim	Carne	Pele/ gordura	Soma
LMR recomendado (µg kg ⁻¹ de tecido)	15 000	6 000	4 000	4 000	
Resíduo marcador em relação aos resíduos totais (%)	40	30	20	40	
Estimativa de resíduos totais (µg kg ⁻¹)	37 500	20 000	20 000	10 000	
Consumo diário (g)	100	10	300	90	500
Ingestão diária teórica máxima de resíduos totais (µg)	3 750	200	6 000	900	10 850
Consumo (% IDA)					24

FONTE: Adaptado de BACILA, D. M. et al. Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. **Food Research International**, n. 99, p. 31–40, 2017.

Nos Estados Unidos, no Código 21 do Regulamento Federal CFR 556.445 da *Food and Drug Administration* (FDA), foi estabelecido um único

LMR para nicarbazina de 4 mg kg⁻¹ para os diferentes tecidos de frango de corte (ESTADOS UNIDOS, 2012), no entanto, não é mencionado se os resíduos de nicarbazina são expressos como DNC.

No *Codex Alimentarius*, encontra-se estabelecido o LMR da nicarbazina no valor de 200 µg kg⁻¹ de tecido, expresso no seu componente DNC, para carne *in natura*, fígado, rim e gordura/pele de frangos de corte. (FAO; OMS, 2018). O Brasil segue os mesmos LMRs estabelecidos no *Codex Alimentarius*. (BRASIL, 2015a; BRASIL, 2015c).

Na Tabela 8 é apresentado um comparativo dos LMR e IDA de nicarbazina estabelecidos no *Codex Alimentarius* e nas legislações do Brasil, Estados Unidos e União Europeia.

TABELA 8 – COMPARATIVO DA INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL E LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO DNC EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE

	Codex (FAO/OMS)	Brasil	Estados Unidos	União Europeia
IDA (µg kg_{m.c.}⁻¹)	400	-	-	770
LMR em tecidos de frango de corte (µg kg⁻¹)				
Carne	200	200	4 000	4 000
Fígado	200	200	4 000	15 000
Rim	200	200	4 000	6 000
Pele/gordura	200	200	4 000	4 000

FONTE: Adaptado de BACILA, D. M. et al. Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. **Food Research International**, n. 99, p. 31–40, 2017.

2.3 OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DA NICARBAZINA

Muitos países têm relatado a ocorrência de resíduos químicos, como os anticoccidianos, em alimentos. (DANAHER et al., 2008; KANTIANI et al., 2010; CLARKE et al., 2014). Um levantamento realizado pela Embrapa Suínos e Aves apontou que os anticoccidianos representam 45% das moléculas de maior interesse para pesquisa na cadeia de aves. (FEDDERN; LIMA, 2015).

A nicarbazina é um anticoccidiano amplamente utilizado, no entanto, a principal preocupação com seu uso, diz respeito à deposição de resíduos em tecidos comestíveis acima dos LMRs permitidos, o que é questionável quanto à segurança do consumidor. Apesar de muitas autoridades considerarem o período de retirada suficiente, contaminações com o resíduo da nicarbazina têm sido relatadas. (KANTIANI et al., 2010; CLARKE et al., 2014; BRASIL, 2017).

2.3.1 Tecidos comestíveis de frango

A nicarbazina possui rápida dissociação *in vivo* em duas substâncias: 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC) e 2-hidroxi-4,6-dimetil-pirimidina (HDP). O componente HDP é eliminado principalmente na urina (90%), com maior biotransformação que o composto DNC, sendo este último e seus metabólitos excretados, principalmente, nas fezes (46%). Desta forma, em alimentos de origem animal, como carne de frango, a maior preocupação está nos resíduos do componente DNC da nicarbazina, pois este tem maior persistência no organismo animal. (FAO; OMS, 1999; EFSA, 2010a).

Na Tabela 9 estão demonstradas as principais características de quatro estudos que conduziram a avaliação de resíduos de DNC em diferentes tecidos de frango (fígado, peito de frango, pele/gordura e rim).

Penz, Vieira e Ludke (1999) avaliaram a concentração de DNC em tecidos de frangos de corte em três lotes consecutivos, com reutilização da cama de aviário de um lote para outro, sendo o período de retirada do aditivo de 7 dias antes do abate. A nicarbazina foi adicionada em diferentes concentrações (100 e 125 mg kg⁻¹ de ração) como único anticoccidiano e combinada com maduramicina (40 mg kg⁻¹ de ração). Quanto aos tecidos estudados, o fígado apresentou a maior concentração de resíduos, independente do lote. Além disso, foi observado que os resíduos persistiram na cama por mais de dois lotes após a retirada da nicarbazina da ração.

Cannavan e Kennedy (2000) realizaram um experimento com diferentes doses de nicarbazina na ração (0,2; 0,4; 1,6; 4,2 e 13,5 mg kg⁻¹). No fígado, para as concentrações mais elevadas, o limite de 200 µg kg⁻¹ de tecido foi excedido, porém na carne, os resíduos encontrados estavam dentro do estabelecido. Os autores afirmam que para a prevenção da ocorrência de resíduos no fígado de frango deve ser assegurado que os níveis de nicarbazina devem ser inferiores a 2,4 mg kg⁻¹ de ração, considerando o alojamento em cama de aviário. O'Keeffe et al. (2007) avaliaram o efeito do período de retirada, observando que 1,6 mg kg⁻¹ de DNC ainda permaneceram no fígado, após um período de retirada de 6 dias de DNC da ração.

Em estudo conduzido por O'Keeffe et al. (2007), realizou-se a avaliação de DNC em fígado de frango, devido a não conformidades identificadas no

monitoramento de resíduos. Investigações foram conduzidas em 32 lotes comerciais de frangos de corte, considerando períodos de retirada de 3 a 10 dias. Para período superior a 6 dias, foi detectado DNC em níveis superiores a $1\,600\ \mu\text{g kg}^{-1}$ de tecido.

TABELA 9 – AVALIAÇÃO DO RESÍDUO DNC EM TECIDOS DE FRANGO DE CORTE

Nicarbazina na ração (mg kg^{-1})	Período de retirada (dias)	Matriz avaliada	Resíduos de DNC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Metodologia analítica	País	Referência
100	7	Fígado	371	Colorimetria	Brasil	PENZ; VIEIRA; LUDKE (1999)
100	7		517			
100	7		318			
125	7		371			
125	7		583			
125	7		351			
40 *	7		118			
40 *	7		46			
40 *	7		88			
0-13,5 *	5		1 150	HPLC- UV	Reino Unido	CANNAVAN; KENNEDY (2000)
0,7	6	Fígado	50	HPLC- UV	Irlanda	O'KEEFFE et al. (2007)
0,14	8		33			
0,26	10		68			
0,48	6		19			
0,67	7		106			
1,2	4		865			
2,9	9		47			
3,4	9		609			
4,9	7		1 119			
9,2	6		419			
11	9		1 624			
22,6	3		1 592			
125	1		9 249	LC-MS/MS	União Europeia	EFSA (2010a)
125	5		453			
125	7		< 50			
100	7	Peito de frango	12	Colorimetria	Brasil	PENZ; VIEIRA; LUDKE (1999)
100	7		0			
125	7		0			
125	7		0			
40 *	7		13			
40 *	7		0			
125	1		2 110	LC-MS/MS	União Europeia	EFSA (2010a)
125	5		45			
125	7		< 25			
0-13,5 *	5	Pele/ gordura	150	LC-MS	Reino Unido	CANNAVAN; KENNEDY (2000)
125	1		2 327	LC-MS/MS	União Europeia	EFSA (2010a)
125	5		131			
125	7		< 27			
125	1	Rim	3 007	LC-MS/MS	União Europeia	EFSA (2010a)
125	5		< 100			
125	7		< 100			

FONTE: PENZ; VIEIRA; LUDKE (1999); CANNAVAN; KENNEDY (2000); O'KEEFFE et al. (2007); EFSA (2010a).

NOTA: * uso de nicarbazina em associação com ionóforos.

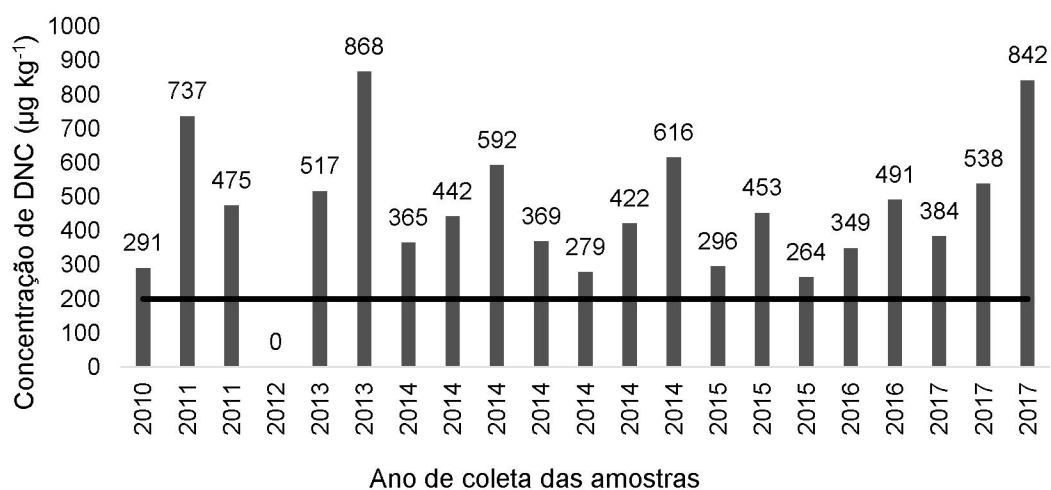
Outro estudo, relacionado a avaliação de resíduos de DNC em tecidos de frango, utilizou dietas contendo nicarbazina na concentração de 125 mg kg⁻¹ de ração, administrada durante 28 dias. A depleção de resíduos de DNC foi avaliada pela amostragem de tecidos em diferentes períodos de retirada. Foi observada a redução de resíduos em todos os tecidos, especialmente no fígado, o qual apresentou 9,25; 0,45 e < 0,05 mg kg⁻¹ de DNC no primeiro, quinto e sétimo dia de retirada do aditivo da ração, respectivamente. (EFSA, 2010a).

2.3.2 Monitoramento de resíduos

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do MAPA é um programa do governo brasileiro para inspeção e fiscalização de alimentos de origem animal e vegetal, bem como as suas cadeias produtivas. O PNCRC para produtos de origem animal, denominado PNCRC/Animal, é composto por programas setoriais, para realizar o monitoramento em carnes (bovinos, aves, suínos, equinos, avestruzes, caprinos e ovinos), leite, mel, ovos e pescados. As amostras são coletadas por fiscais federais agropecuários, em diversos estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal. (MAURICIO; LINS; ALVARENGA, 2009; BRASIL, 2017).

Nos resultados do PNCRC/Animal, referente ao monitoramento de 2010 a 2015, na categoria de aves de corte, para os anticoccidianos monitorados, foram encontradas 15 não conformidades, todas relacionadas apenas a nicarbazina (expressa como DNC), com destaque para o resultado de 2014, no qual foram registrados 7 desvios, conforme apresentado na FIGURA 2. (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011; BRASIL 2012; BRASIL, 2013, BRASIL, 2014; BRASIL, 2015c). Nos últimos dois monitoramentos publicados, foram detectadas duas não conformidades em 2016 e três em 2017, para nicarbazina em carne de frango. (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017).

FIGURA 2 – NÃO CONFORMIDADES DO ANTICODIANO NICARBAZINA DETECTADAS EM CARNE DE FRANGO NO PLANO NACIONAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES DO MAPA



FONTE: BRASIL (2010); BRASIL (2011); BRASIL (2012); BRASIL (2013); BRASIL (2014); BRASIL (2015c); BRASIL (2016); BRASIL (2017).

LEGENDA: linha contínua representa o LMR de DNC (200 µg kg⁻¹).

NOTA: nº de amostras analisadas em 2010: 513; 2011: 510; 2012: 513; 2013: 511; 2014: 457; 2015: 447; 2016: 603; 2017: 603. No ano de 2012 ocorreu o ajuste da análise multiresíduos para a nicarbazina.

2.3.3 Estratégias para degradação do resíduo DNC em carne de frango

O processamento térmico empregado na carne de aves pode ser conduzido com a finalidade de promover alterações sensoriais desejáveis, remover/reduzir micro-organismos patogênicos, estabilização da cor, além de redução de resíduos químicos presentes. (DAWSON; MANGALASSARY; SHELDON, 2006).

Na condução de um processamento térmico, realiza-se a aplicação de um binômio tempo *versus* temperatura. Existem várias possibilidades para tratamento térmico de carnes que podem ser classificados dentro de três grupos. No primeiro grupo (úmido), o processamento térmico tem como fonte de calor um meio líquido quente, o qual pode ser água ou vapor. A temperatura da água pode alcançar 100 °C e gerar uma transferência significativa de calor ao alimento, por exemplo, o cozimento em água. No segundo grupo (seco), a fonte de calor inclui óleo, ar quente e superfícies aquecidas. Na fritura, o óleo permite melhores transferências de calor nas temperaturas de 150-190 °C. Para o forneamento, o ar quente pode atingir até 200 °C. Na terceira categoria (micro-ondas), ocorre a geração de ondas eletromagnéticas. Para o processamento

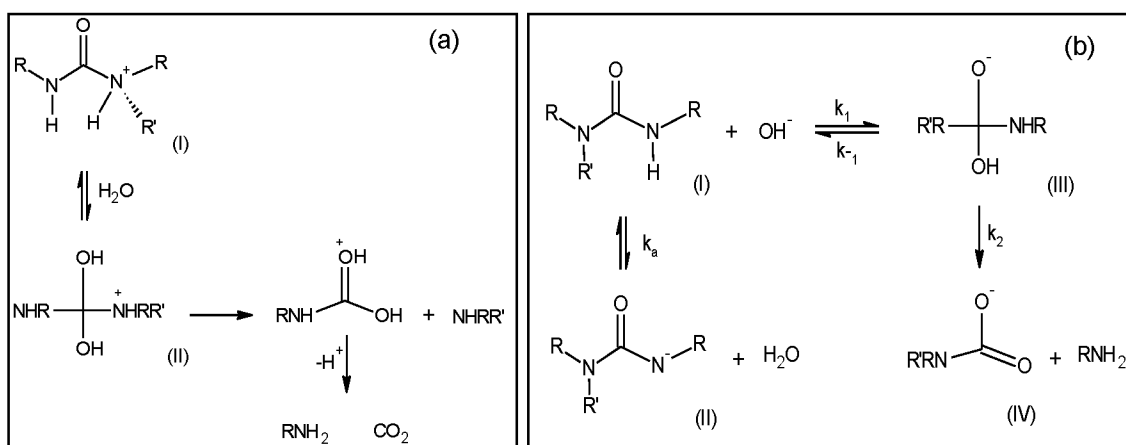
térmico em micro-ondas, geralmente as frequências empregadas estão entre 915-2450 MHz e a temperatura no alimento não ultrapassa 100 °C. (THIPPAREDDI; SANCHEZ, 2006).

Levando-se em consideração os aspectos relativos à garantia da segurança dos alimentos fornecidos ao consumidor, é importante que seja conhecido o efeito do tratamento térmico dos produtos cárneos na degradação de resíduos químicos. (MOATS, 1999).

Rose et al. (2000) avaliaram quatro tipos de tratamentos térmicos em carne de frango contendo DNC: cozimento em água, por micro-ondas, grelha e fritura. Foi constatado que para o primeiro método não ocorreu redução significativa no conteúdo de DNC, mas nos três últimos processos foi verificada a redução do resíduo nos tecidos na faixa de 22 a 31%. Trabalho similar foi realizado por Tarbin et al. (2005) indicando que o cozimento no micro-ondas, bem como fervura em água, não ocasionaram mudanças significativas no teor de resíduos de DNC. No entanto, quando as amostras foram grelhadas ou fritas, a redução deste resíduo no peito de frango foi de 29 e 22%, respectivamente. O monitoramento da temperatura não foi realizado durante os experimentos. Além disso, avaliaram a estabilidade da DNC em soluções aquosas e sugeriram a *p*-NA como potencial produto da degradação da DNC.

Fenilureias análogas à DNC podem sofrer degradação hidrolítica resultando nas aminas derivadas correspondentes (AUDU; HEYN, 1988; LAUDIEN; MITZNER, 2001a,b; SALVESTRINI, et al., 2002). Em meio ácido, a hidrólise provavelmente segue por via de um mecanismo de adição-eliminação (Figura 3a) envolvendo: a protonação do átomo de nitrogênio ligado à carbonila da fenilureia (I), o ataque nucleofílico da água no carbono carbonílico para formar o intermediário tetraédrico (II); e a eliminação da respectiva amina. (LAUDIEN; MITZNER, 2001b). Quando esta reação se processa em meio alcalino, é possível assumir um mecanismo (Figura 3b) em que: o íon hidróxido ataca o carbono carbonílico da fenilureia (I) para resultar no intermediário tetraédrico (III); a água transfere um próton para o grupo de saída, facilitando a eliminação da respectiva anilina (LAUDIEN; MITZNER, 2001a).

FIGURA 3 – MECANISMOS PARA HIDRÓLISE DE FENILUREIAS EM MEIOS ÁCIDO E ALCALINO



FONTE: Adaptado de LAUDIEN; MITZNER (2001a,b).

LEGENDA: (a) hidrólise em meio ácido e (b) hidrólise em meio alcalino; $R=R'=\emptyset-NO_2$.

As análises térmicas podem ser úteis para obtenção do perfil de decomposição térmica do composto principal e auxiliar na identificação dos produtos de degradação de resíduos em alimentos processados termicamente. (MORELLI, 1990).

Dentre as análises térmicas disponíveis, a análise simultânea de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial acoplada à espectrometria de massas (TGA-DSC-MS) pode ser empregada para avaliar o comportamento térmico de substâncias. Além disso, a técnica de pirólise associada a cromatografia gasosa e a espectrometria de massas (Py-GC-MS) é um método no qual a amostra é submetida a variações de temperatura que levam a sua decomposição em uma atmosfera inerte. Fragmentos dos compostos são gerados, sendo estes separados por cromatografia e identificados no espectrômetro de massas. (XIE et al., 2007; SOBEIH; BARON; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2008; TIAN, 2016; ATTIA et al., 2017). Desta forma, estas técnicas são promissoras na avaliação de produtos de degradação de resíduos químicos em alimentos submetidos a tratamentos térmicos. No entanto, inexistem informações a respeito do perfil de decomposição térmica de resíduos de DNC e seus produtos de degradação, informação relevante, pois em alguns casos estes produtos podem ser mais tóxicos que o composto principal. (NGUYEN et al., 2015).

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO DE LITERATURA

Com relação à avaliação da revisão de literatura realizada, verificou-se que o Brasil ocupa posições relevantes quanto à produção e exportação de carne de frango no cenário mundial. Vários aditivos são autorizados na avicultura comercial, como em frangos de corte, pois são necessários para a produção de carne com qualidade e competitividade. O monitoramento e o controle dos resíduos destes aditivos em produtos de origem animal são conduzidos pelo MAPA. Quanto ao anticoccidiano nicarbazina, foram verificadas não conformidades nas amostras coletadas nos últimos 8 anos.

O resíduo de interesse da nicarbazina é a 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC). Embora seja possível encontrar níveis de DNC superiores ao LMR ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$ de tecido), a carne de frango é consumida após preparo por diferentes métodos de processamento térmico. Isso significa que avaliar o impacto de tratamentos térmicos sobre o componente DNC na carne pode contribuir na avaliação dos reais riscos de exposição dos consumidores a estes resíduos químicos contidos em produtos cárneos. Poucos trabalhos tratam da redução da concentração de DNC em carne de frango como decorrência do processamento térmico.

As pesquisas que conduziram o estudo da degradação de DNC na carne processada termicamente não avaliaram o tratamento térmico da carne em forno, nem controlaram a temperatura durante os experimentos, o que é relevante para entender o fenômeno de degradação do resíduo. Tarbin et al. (2005) sugeriram a *p*-NA como produto da degradação da DNC em soluções aquosas, mas em carne de frango contendo DNC e processada termicamente não foram encontradas informações sobre a identificação e a quantificação da *p*-NA. Além disso, as informações toxicológicas disponíveis sugerem que a *p*-NA apresenta maior toxicidade que a DNC. No entanto, provavelmente, devido à falta de informações sobre a ocorrência da *p*-NA como produto da degradação do resíduo DNC em carne de frango, não foram encontrados na literatura valores de IDA e LMR para a *p*-NA.

Logo, no contexto da avaliação da influência dos tratamentos térmicos sobre o conteúdo de DNC em carne de frango, ainda persistem lacunas nas pesquisas que levam em consideração: o acompanhamento da degradação do resíduo de DNC pela aplicação dos métodos mais comuns de preparo da carne

de frango; o monitoramento e alcance da temperatura de cozimento; perfil da decomposição térmica do composto; explicação do fenômeno de degradação do resíduo DNC e a identificação dos produtos de degradação que possam impactar na segurança do alimento.

Com relação ao uso das análises térmicas para obtenção de informações relacionadas à degradação de compostos, verificou-se que as técnicas são empregadas com diversos propósitos, mas são pouco exploradas para auxiliar na avaliação da decomposição de resíduos químicos em alimentos submetidos a tratamentos térmicos. Além disso, informações quanto à identificação e quantificação de produtos da degradação de DNC, em carne de frango processada termicamente, não foram encontradas na literatura consultada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia adotada para esta tese constitui uma pesquisa aplicada de acordo com os seus objetivos e pesquisa de laboratório quanto as fontes de informação. Este estudo possui uma abordagem predominantemente quantitativa do tipo experimental. (CRUZ; RIBEIRO, 2004).

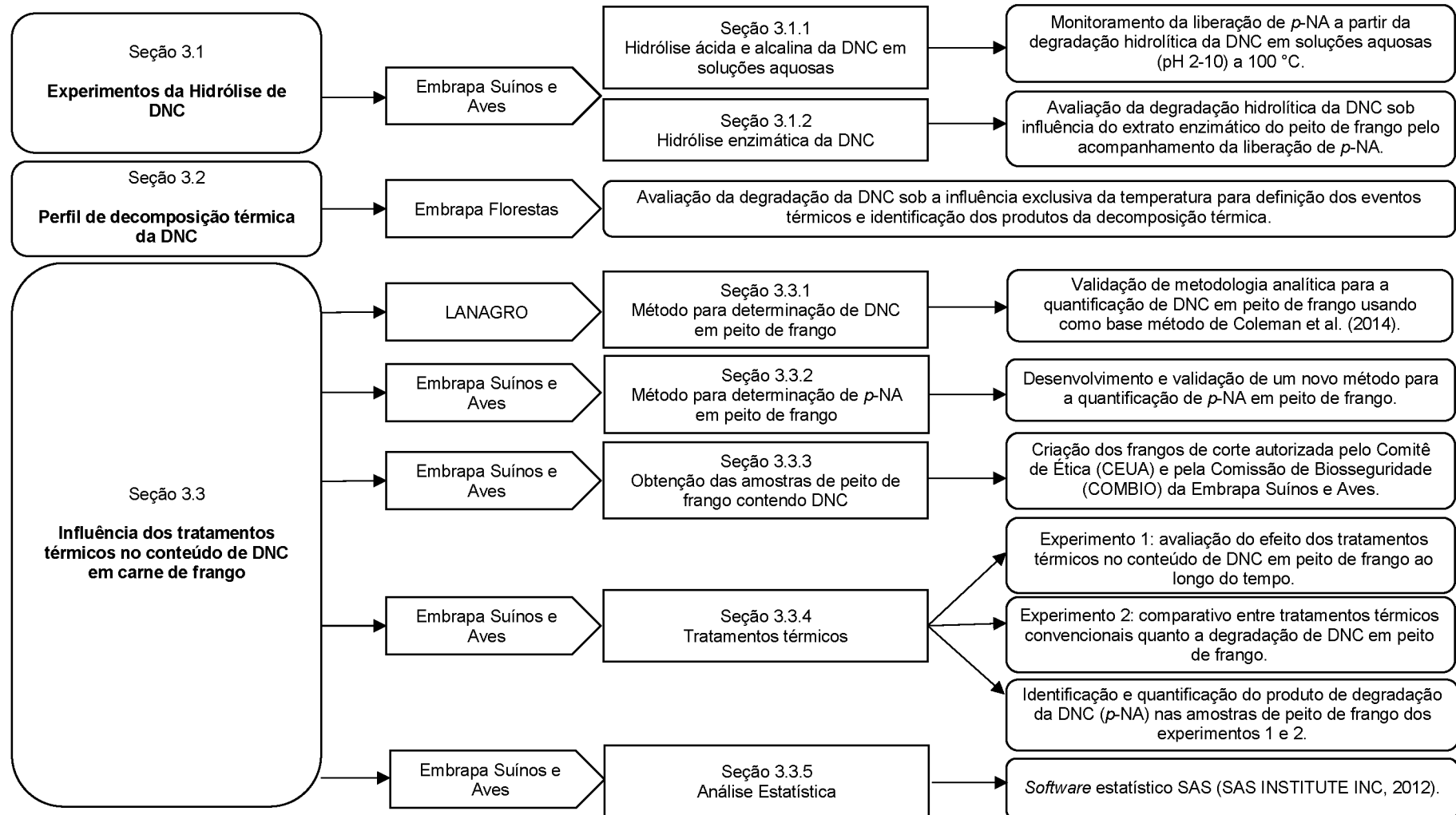
Neste estudo foram conduzidas as seguintes avaliações:

- ✓ hidrólise de DNC em meio ácido e alcalino;
- ✓ hidrólise enzimática;
- ✓ perfil da decomposição térmica da DNC por meio de análises térmicas;
- ✓ influência de diferentes tratamentos térmicos sobre os resíduos de DNC em carne de frango, considerando o efeito dos tratamentos térmicos sobre o conteúdo de DNC (experimento 1) e a eficiência dos tratamentos térmicos na degradação de DNC na carne (experimento 2);
- ✓ identificação e quantificação do produto de degradação (*p*-NA) da DNC em peito de frango.

Os ensaios da hidrólise ácida, básica e enzimática, dos tratamentos térmicos, bem como o desenvolvimento de método para quantificação da *p*-NA em peito de frango e detecção na água de cozimento foram realizados nas instalações da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia-SC, no Laboratório de Análises Físico-Químicas e de Tecnologia de Carnes. Os experimentos a campo foram executados nos aviários da Embrapa. As análises de LC-MS/MS para quantificação do resíduo de DNC em peito de frango foram realizadas no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do MAPA, na seção laboratorial avançada localizada em São José-SC. Os ensaios das análises térmicas foram executados no laboratório da Embrapa Florestas em Colombo-PR.

O diagrama conceitual da seção de material e métodos da tese está apresentado na Figura 4.

FIGURA 4 – DIAGRAMA CONCEITUAL DA SEÇÃO DE MATERIAL E MÉTODOS DA TESE



FONTE: O autor (2019).

3.1 EXPERIMENTOS DA HIDRÓLISE DE DNC

Para avaliar a degradação da DNC em soluções aquosas, foram conduzidos ensaios para avaliar a sua degradação hidrolítica, em meios ácido e alcalino, pelo monitoramento da liberação de *p*-NA para posterior investigação deste produto de degradação na carne de frango. Além disso, foi conduzida avaliação da degradação da DNC sob influência do extrato enzimático do peito de frango.

3.1.1 Hidrólise ácida e alcalina

Foi conduzido estudo da hidrólise de DNC usando como base o método publicado por Audu; Heyn (1988) com modificações. A hidrólise foi realizada na temperatura de 100 °C, utilizando a concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DNC, 5 condições de pH (2, 4, 6, 8 e 10) e 6 tempos (0, 2, 4, 6, 8 e 10 h). Foram preparadas soluções tampão com pH 2 (biftalato/HCl), 4 (biftalato/hidróxido), 6 (fosfato/hidróxido), 8 (fosfato/hidróxido) e 10 (borato/hidróxido). A força iônica dos tampões foi ajustada pela adição de KCl a 1 mol L^{-1} . Em uma série de 6 tubos de ensaio foram adicionados 50 μL de solução da DNC a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em dimetilformamida (DMF), 250 μL de DMF, e 2,7 mL da respectiva solução tampão. Os tubos contendo as soluções do ensaio foram agitados em vortex. Em seguida, estes foram acomodados em banho de areia e aquecidos em estufa (100 °C). Os tubos foram retirados nos seguintes tempos de hidrólise 2, 4, 6, 8, e 10 h, e imediatamente colocados sob refrigeração (4 °C). Na sequência, foram adicionados reagentes para promover a reação colorimétrica do produto de degradação da DNC. A *p*-NA liberada foi determinada conforme método de diazotação tendo como base a reação de Bratton-Marshall (BRATTON; MARSHALL, 1939). Foram adicionados consecutivamente: 500 μL de HCl 2 mol L^{-1} ; 50 μL de NaNO_2 2% (m/v), o qual promove a reação de diazotação da *p*-NA; 50 μL de ácido sulfâmico 10% (m/v), gera a eliminação do NaNO_2 em excesso e libera nitrogênio; e 200 μL de N-(Naftil)-etilenodiamina dihidroclorato monometanolato (NED) 0,1% (m/v), forma um azo composto da *p*-NA, conferindo a coloração rosa à solução. Após a reação, a solução foi transferida para um tubo de Falcon e o seu volume foi corrigido para 5 mL. A leitura da absorbância

foi conduzida em espectrofotômetro UV-VIS Varian Cary 50, em comprimento de onda de 545 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A concentração de *p*-NA determinada nos ensaios foi utilizada para obter o conteúdo de DNC que foi degradado e a sua concentração final. Os dados foram submetidos à análise cinética da hidrólise, em diferentes níveis de pH, na temperatura de 100 °C, para determinar o modelo de degradação de DNC de melhor ajuste aos dados experimentais. A metodologia cinética seguiu os princípios recomendados por Fogler (2009).

A hipótese de modelo cinético adotada neste estudo da hidrólise de DNC está representada na equação (2).

$$-\frac{d[DNC]}{dt} = k \times [DNC] \times [H_2O] \quad (2)$$

Onde $-\frac{d[DNC]}{dt}$ é a derivada da concentração de DNC em relação ao tempo *t* da reação de hidrólise, *k* é a constante da taxa de degradação, [DNC] é a concentração de DNC em diferentes tempos de hidrólise, e [H₂O] é a concentração de água na reação.

Considerando que a água estava em excesso na reação de hidrólise, a cinética testada foi de pseudo-primeira ordem. Como a concentração final de água na reação de hidrólise é praticamente inalterada com relação ao valor inicial ($[H_2O] \approx [H_2O]_i$), a equação (2) resulta em:

$$-\frac{d[DNC]}{dt} = k' \times [DNC] \quad (3)$$

Integrando a equação (3), é obtida a equação (4):

$$\ln \frac{[DNC]}{[DNC]_i} = -k' \times t \quad (4)$$

Onde $[DNC]_i$ é a concentração inicial de DNC no tempo zero.

Aplicando a transformação logarítmica na equação (4) é obtida:

$$\frac{[DNC]}{[DNC]_i} = e^{-k't} \quad (5)$$

O percentual de degradação de DNC (*y*) em diferentes tempos de hidrólise foi calculado pela equação (6):

$$y = \frac{[DNC]_i - [DNC]}{[DNC]_i} \times 100 \quad (6)$$

Combinando a equação (5) com a equação (6), resulta a equação (7):

$$y = (1 - e^{-k't}) \times 100 \quad (7)$$

Plotando os dados experimentais ($\ln \frac{[DNC]_i}{[DNC]}$ versus tempo) nos gráficos cinéticos, a constante da taxa de degradação (k') foi obtida do coeficiente angular (valor absoluto) da equação da reta ajustada, na temperatura de 100 °C, para a concentração inicial de 10 µM de DNC, para cada pH.

Com a equação (7), foi calculada a degradação teórica (y_{modelo}) com k' médio e comparado com a degradação experimental ($y_{\text{experimental}}$) para a validação do modelo cinético para cada valor de pH.

3.1.2 Hidrólise enzimática

Os ensaios da hidrólise enzimática da DNC foram conduzidos considerando os princípios do método publicado por de Lee; Anstee (1994) com adaptações.

Foram utilizados peitos de frango sem pele, os quais foram obtidos de 6 frangos de corte alimentados com ração livre de nicarbazina.

Para a determinação da atividade enzimática, foi realizada a obtenção do extrato enzimático de amostras de peito de frango. Para isso, 6 g de peito de frango foram adicionados a 6 mL de tampão Tris-HCl a 80 mmol L⁻¹ (pH 7,8 e CaCl₂ a 100 mmol L⁻¹) em um tubo de polipropileno de 50 mL. Foi realizada a homogeneização da amostra por meio de um triturador durante 60 s. A centrifugação da amostra foi conduzida a 3 900 x g, a 5 °C por 10 min. Para recuperar as enzimas do extrato, o sobrenadante foi transferido para Eppendorf (2 mL) e centrifugado a 20 000 x g, a 5 °C por 5 min.

Para obtenção da atividade proteolítica, foi utilizado como substrato o composto N-succinil-fenilalanina-*p*-nitroanilida, o qual foi preparado na concentração de 1 mmol L⁻¹ em tampão Tris-HCl a 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8 e CaCl₂ a 60 mmol L⁻¹). O volume de 2,5 mL da solução do substrato foi adicionado em um tubo de polipropileno de 15 mL e homogeneizado com 0,8 mL de

dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,3 mL do tampão Tris-HCl a 50 mmol L⁻¹. O volume de 0,4 mL do extrato enzimático do peito de frango foi transferido ao tubo contendo a solução do substrato e incubado a 37 °C durante 45 min. Após completar este tempo, a reação foi cessada pela adição de HCl a 2 M no tubo imerso em um banho de gelo. O método de diazotação foi utilizado para determinar a *p*-NA liberada (BRATTON; MARSHALL, 1939). Após a adição do ácido, foram adicionados ao tubo: 0,12 mL da solução aquosa NaNO₂ 2% (m/v); 0,12 mL da solução aquosa de ácido sulfâmico 10% (m/v); e 0,31 mL de solução aquosa de N-(Naftil)-etilenodiamina dihidroclorato monometanolato (NED) 0,1% (m/v). A absorbância foi medida no comprimento de onda de 545 nm por meio de espectrofotômetro Varian Cary 50 UV-Vis (Varian, EUA). Foi definida como uma unidade de protease, a quantidade de extrato enzimático que liberou 1 nmol de *p*-NA do substrato no tempo de 1 min (U/mL).

Para preparar solução de DNC a 2 mmol L⁻¹, a DNC foi solubilizada em DMSO. O volume de 0,2 mL desta solução foi adicionado em um tubo de polipropileno de 15 mL e homogeneizado com 0,6 mL de DMSO e 2,8 mL de tampão Tris-HCl a 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8 e CaCl₂ a 60 mmol L⁻¹). O volume de 0,4 mL do extrato enzimático obtido foi transferido ao tubo e incubado a 37 °C durante 45 min. Após completar este tempo, a reação foi cessada pela imersão do tubo em banho de gelo e adição de HCl 2 mol L⁻¹. A *p*-NA liberada foi determinada conforme procedimento descrito anteriormente para o substrato.

A análise estatística dos dados foi conduzida por ANOVA com o *software* estatístico SAS (SAS INSTITUTE INC, 2012) pela comparação das médias para avaliar os efeitos da presença ou ausência de enzima na hidrólise de DNC.

3.2 PERFIL DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DA DNC

Para obter o perfil de decomposição térmica do resíduo DNC e avaliar a sua degradação perante a influência exclusiva da temperatura, foram conduzidas análises térmicas, conforme descrito a seguir.

O composto 4,4'-dinitrocarbanilida (97% de pureza) foi adquirido da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

Os experimentos de análise térmica simultânea de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial (TGA-DSC-MS) foram realizados em um

equipamento SDT Q600 (v.20.9.20) da TA Instruments acoplado a um espectrômetro de massas *Discovery* (TA, New Castle, DE, EUA). As massas das amostras de DNC ($2,11 \pm 0,08$ mg) foram adicionadas em cadinhos de platina e submetidas a uma taxa de aquecimento de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nitrogênio foi utilizado como gás de purga a um fluxo de 50 mL min^{-1} . O desempenho do instrumento foi verificado previamente com oxalato de cálcio monohidratado. Os dados do TGA-DSC-MS foram obtidos por meio de *software* TA-60WS (v.4.7B) e *Process eye professional software* (v. 1.017). O espectrômetro de massas (MS) foi operado a 70 eV. Primeiramente, foi selecionada a faixa de *scanning* de 1 a 100 Da para pesquisar as principais relações de massa e carga (m/z) por meio do modo *Barchart* (varredura). Na sequência, foram monitorados no modo *Peak Jump* (picos específicos) os principais fragmentos de massas detectados (por exemplo: m/z 41, 43, 44 e 65) a fim de obter uma avaliação mais fina. O espectrômetro de massas do tipo quadrupolo foi equipado com um sistema de detector duplo, o qual incluiu um detector de gaiola de Faraday e multiplicador de elétrons secundário. As análises foram realizadas em triplicata.

Experimentos em pirolisador acoplado a um cromatógrafo a gás e espectrômetro de massas (Py-GC-MS) foram conduzidos a fim de elucidar os produtos da decomposição térmica da DNC verificados na análise de TGA-DSC-MS. As temperaturas selecionadas foram de 200, 250, 260 e $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s usando uma *pyroprobe* (sonda de pirólise) CDS 5000 (CDS analytical, Oxford, EUA). O filamento para aquecimento foi ajustado a $15\text{ }^{\circ}\text{C ms}^{-1}$. As condições adotadas para a *pyroprobe* foram: temperatura de interface de $50\text{--}280\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ por 2 min; forno e linha de transferência a $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os produtos de pirólise foram analisados usando um MS Polaris Q ion trap (Thermo, Waltham, EUA). O analito DNC ($\sim 0,5$ mg) foi introduzido na *pyroprobe* em um injetor split/splitless (split 1:50, $230\text{ }^{\circ}\text{C}$). As separações foram realizadas em coluna capilar da Agilent J&W DB-5ms (30 m x 0,25 mm; 0,25 μm espessura filme). O forno do GC foi programado de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (por 2 min) a $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ na taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. O gás de arraste foi o hélio na vazão de $1,0\text{ mL min}^{-1}$. A interface do GC-MS e as temperaturas da fonte de ionização foram de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O MS foi operado a 70 eV em modo de ionização positivo com faixa de scan de m/z 10–450, taxa de 0,48 scan s^{-1} . A corrente foi ajustada para 250 mA. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3 INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS NO CONTEÚDO DE DNC EM CARNE DE FRANGO ¹

Amostras de peito de frango foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos (cozimento em água, grelha, micro-ondas, fritura e forneamento) a fim de verificar a degradação de resíduos de DNC e a liberação do seu produto de degradação, a *p*-nitroanilina. O peito de frango foi escolhido, dentre as várias possibilidades de tecidos de frango (peito, coxa, fígado, pele/gordura, rim, coração, etc.), porque é um dos cortes mais consumidos e exportados pelo Brasil. As amostras foram obtidas de experimento a campo (contaminação natural). Para a quantificação de DNC e *p*-NA nas amostras de peito de frango foram necessários o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas.

O uso das informações geradas nesta tese e publicadas no *Journal of Agricultural and Food Chemistry* sobre os métodos analíticos adotados neste estudo para determinação de DNC em peito de frango, bem como a utilização dos resultados obtidos encontram-se devidamente aprovados, conforme registros de autorização de uso apresentados no Apêndice 4.

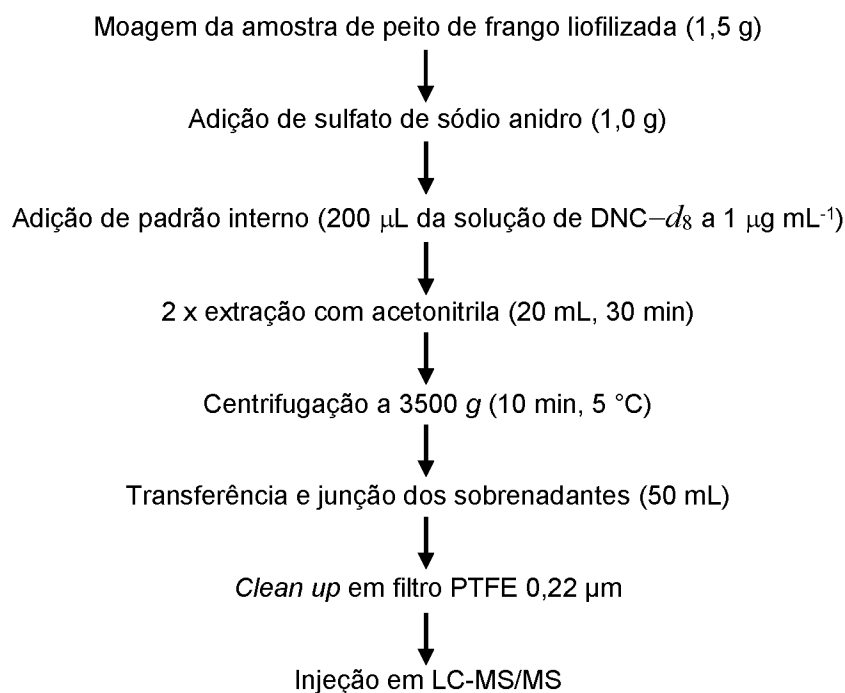
3.3.1 Método para determinação de DNC em peito de frango

A determinação de DNC em peito de frango foi realizada de acordo com metodologia proposta por Coleman et al. (2014) com adaptações. O princípio do método consiste na moagem do peito de frango, adição de sulfato de sódio anidro e extração do analito com acetonitrila. As concentrações de DNC foram determinadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC–MS/MS) com uso de curva de calibração preparada na matriz combinada com padrão interno (dinitrocarbanilida deuterada: DNC-*d*₈).

As principais etapas do procedimento para determinação do resíduo DNC em peito de frango estão descritas no fluxograma da Figura 5.

¹ Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.
Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Detection of *p*-nitroaniline released from degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast during thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 32, p. 9002–9008, 2019). Copyright (2019) American Chemical Society.

FIGURA 5 – ETAPAS DA DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO



FONTE: O autor (2017).

3.3.1.1 Materiais e Reagentes

Os Quadros 2 e 3 demonstram os principais materiais, equipamentos e reagentes utilizados para determinação de DNC em peito de frango.

QUADRO 2 – MATERIAIS PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO
(continua)

Materiais	Características
Micropipetas	Eppendorf Research plus. Part No. 226629Z (20–200 µL), Part No. 136600D (100–1000 µL), Part No. 2759453 (500–5000 µL), Part No. 030298B (1–10 mL)
Balanças analíticas e semi-analíticas	Precisão de 0,01 e 0,00001g
Triturador	Moinho analítico IKA ^R A11 Basic
Misturador vortex	Biomixer Modelo No. QL-901
Agitador de Wagner	Agitação por inversão dos tubos
Tubos de polipropileno	50 mL, cônico, com tampa
Vials para HPLC	Analítica, 2,0 mL

FONTE: O autor (2018).

(conclusão)

Materiais	Características
Filtros de seringa	PTFE hidrofílico, 13 mm, poro 0,22 µm
Centrífuga	IEC, DPR6000, 6000 rpm, refrigerada
LC-MS/MS	1290 Infinity da Agilent 5500 QTRAP da Sciex
Coluna cromatográfica	C18 (partícula 3,5 µm) 2,1 x 50 mm
Liofilizador	JJ Científica LJL-030
Moinho analítico	IKA A11 Basic

FONTE: O autor (2018).

QUADRO 3 – REAGENTES PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO

Reagentes	Características
Metanol (MeOH)	Grau HPLC
Água (H ₂ O)	Água deionizada
Acetonitrila (ACN)	Grau HPLC Merck
Sulfato de Sódio (Na ₂ SO ₄)	Anidro, granular, certificado ACS
Acetato de Amônio (NH ₄ OAc)	Certificado ACS
Ácido Fórmico (FA)	Concentrado, certificado ACS
Ácido acético (HOAc)	Certificado ACS
N,N'-Dimetil formamida (DMF)	Certificado ACS
Padrão de referência de nicarbazina	Sigma-Aldrich Part No. 32409, Lote BCBR5688V
Padrão interno DNC- <i>d</i> ₈	Sigma-Aldrich, Part No. 34214, Lote SZBF063XV

FONTE: O autor (2018).

3.3.1.2 Preparo de soluções

As soluções do analito DNC e do padrão interno foram preparadas conforme descrito nos itens abaixo. (COLEMAN et al. 2014).

1. Solução estoque de DNC a 1000 µg mL⁻¹: em balão volumétrico de 100 mL, foram dissolvidos 108,5 mg de padrão de nicarbazina em dimetilformamida (DMF) usando ultrassom. A massa de nicarbazina foi corrigida (equivalente a 100 mg de DNC) considerando a pureza de 92,23%. A solução foi transferida para tubo de Falcon protegido da luz;
2. Solução intermediária de DNC a 10 µg mL⁻¹: em tubo de Falcon de 50 mL (protegido da luz), foram diluídos 0,5 mL da solução estoque a 1000 µg mL⁻¹ com 49,5 mL de acetonitrila;

3. Soluções trabalho da curva analítica: em tubos de Falcon de 50 mL, adições sucessivas de 0,125, 0,250, 0,625, 2,50, 6,25 e 12,5 mL da solução intermediária de DNC a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram realizadas. O volume foi aferido para 50 mL com acetonitrila. As concentrações finais foram respectivamente 25, 50, 125, 500, 1250 e 2500 ng mL^{-1} ;
4. Solução estoque de DNC- d_8 (1 mg mL^{-1}): em um tubo de Falcon de 15 mL (protegido da luz), 10 mg de DNC- d_8 foram dissolvidos em DMF;
5. Solução de padrão interno de DNC- d_8 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$): em balão volumétrico de 100 mL, 100 μL da solução estoque de DNC- d_8 foram diluídos em acetonitrila.

As validades das soluções seguiram as recomendações descritas por Coleman et al. (2014).

3.3.1.3 Preparo das amostras

As amostras de peito de frango foram preparadas por liofilização. Este procedimento consistiu na desidratação sob vácuo do tecido cárneo após congelamento, sendo que o gelo formado foi eliminado por sublimação. Na sequência, as amostras foram trituradas gerando um pó fino. As etapas referentes ao preparo da amostra estão detalhadas a seguir.

O peito de frango foi cortado em pequenos pedaços em forma de cubo ($\sim 2 \text{ cm}^3$). A amostra em pedaços foi pesada e acondicionada em bandeja de alumínio. Após congelamento a -20°C , as amostras foram desidratadas por no mínimo 24 h em um liofilizador JJ Científica LJI-030 (São Carlos, SP, Brasil), seguindo as recomendações de operação do fabricante do equipamento (quando a pressão da câmara de liofilização era inferior a $10 \times 10^{-3} \text{ mBar}$ e a temperatura das bandejas atingiu -15°C , foi acionado o aquecimento das bandejas que estava ajustado com a programação: ciclo de 3 s de aquecimento a cada intervalo de 15 s. As amostras foram mantidas sob liofilização até a temperatura das bandejas atingir $\sim 20^\circ\text{C}$). Posteriormente, as amostras secas foram processadas em moinho analítico IKA A11 Basic (Staufen, Baden-Württemberg, Alemanha). As amostras liofilizadas devidamente moídas foram acondicionadas em embalagens de plástico e estocadas a -20°C . A perda de

umidade durante o processo de liofilização foi determinada para ser usada na conversão da concentração de DNC ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

3.3.1.4 Extração

Em tubo de Falcon de 50 mL, foram pesadas $1,5 \pm 0,05$ g da amostra de peito de frango liofilizada e moída. Inicialmente, 200 μL da solução de padrão interno de DNC- d_8 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados. Em seguida, 1 g de sulfato de sódio anidro foi incorporado à amostra e homogeneizado em vortex por 30 s. A acetonitrila (20 mL) foi adicionada e a suspensão foi agitada em vortex (30 s) e em agitador de Wagner por 30 min. A mistura foi centrifugada a $3500 \times g$ por 10 minutos a 5°C . O sobrenadante foi transferido para outro tubo e a extração foi repetida por mais uma vez. Os sobrenadantes foram combinados e o volume foi ajustado para 50 mL. A solução da amostra foi filtrada em membrana de $0,22 \mu\text{m}$ e o filtrado foi coletado em *vial* de 2 mL. As soluções foram armazenadas a -20°C por no máximo 72 h. As análises foram realizadas em duplicata.

3.3.1.5 Preparo da curva de calibração na solução da matriz combinada com padrão interno

A curva analítica foi preparada pela combinação da solução do extrato da matriz com quantidades conhecidas do analito DNC e com o padrão interno DNC- d_8 . Foram obtidos seis pontos de calibração.

Primeiramente, em tubos de Falcon de 50 mL, foram pesados $1,5 \pm 0,05$ g da amostra liofilizada e moída. O procedimento de extração foi conduzido conforme descrito no item 3.3.1.4. Após esta etapa, foram adicionados aos tubos, respectivamente, 1 mL das soluções preparadas no subitem 3 da seção 3.3.1.2, cujas concentrações foram 25, 50, 125, 500, 1250 e 2500 ng mL^{-1} , obtendo as concentrações finais de 0,5; 1,0; 2,5; 10; 25 e 50 ng mL^{-1} . O volume foi aferido, com acetonitrila, para 50 mL e as etapas finais do procedimento de determinação do analito puderam ser continuadas.

3.3.1.6 Método de quantificação do analito DNC

As soluções das amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido Agilent 1290 Infinity (Waldbronn, Alemanha) acoplado a um espectrômetro de

massa Sciex QTRAP 5500 (Foster City, EUA). A separação cromatográfica foi realizada com eluição em modo gradiente em uma coluna Waters C18 Symmetry (50 mm x 2,1 mm, 3,5 μm) com pré-coluna Phenomenex AJ0-4287 C18 (4,0 mm x 3,0 mm). A composição da fase móvel foi: fase móvel A contendo água com 0,05 % de ácido acético e 0,5 mM de acetato de amônio e fase móvel B contendo metanol com 0,05 % de ácido acético e 0,5 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. O modo de eluição gradiente foi de: 0 a 1 min, 95 % da fase A e 5 % da B; de 1 a 5 min, 50 % de cada fase; de 5 a 6 min, 10 % da fase A e 90 % da fase B; de 6 a 7 min, 30 % da fase A e 70 % da fase B; de 7 a 9 min, 95 % da fase A e 5 % da B. O fluxo da fase móvel foi 0,3 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna, 40 °C. O volume de injeção foi de 5 μL .

O espectrômetro de massas operou em modo de ionização negativo, com monitoramento seletivo de reações. A transição determinativa para o analito DNC foi de m/z 301,0 \rightarrow 137,0 e para o padrão interno DNC- d_8 foi de m/z 308,9 \rightarrow 141,2. A transição confirmatória para o analito DNC foi de m/z 301,0 \rightarrow 106,8 e para o DNC- d_8 foi de m/z 308,9 \rightarrow 111,0. Os parâmetros adotados para a operação do equipamento foram: resolução unitária; nitrogênio como gás de cortina (25,0 CUR); potencial na fonte de íons: -4500 V; dissociação ativada por colisão (alta); potencial de orifício de 55 V; e temperatura na fonte de íons de 500 °C. Os parâmetros específicos do analito e do padrão interno, incluindo energia de colisão (CE) nas transições determinativa e confirmatória, potencial de saída da cela de colisão (CXP), potencial de entrada (EP), potencial de orifício (DP), estão apresentados na Tabela 10. Os dados foram adquiridos utilizando os softwares *Analyst* 1.6.2 e *Multi Quant* 3.0.

TABELA 10 – PARÂMETROS PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO POR LC-MS/MS

Analito	Transição	T _R (min)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
DNC	Determinativa	6,86	301,0	137,0	-50	-10	-18	-13
	Confirmatória	6,86	301,0	106,8	-50	-10	-50	-15
DNC- d_8	Determinativa	6,83	308,9	141,2	-50	-10	-22	-9
	Confirmatória	6,83	308,9	111,0	-50	-10	-50	-9

Fonte: VALESE et al. (2017).

Na confirmação qualitativa, foram identificados o tempo de retenção do analito de interesse e do padrão interno, com confirmação da identidade pela comparação dos íons produto obtidos nas amostras e aqueles evidenciados nas injeções padrão em ambas as massas e a intensidade relativa. Os cromatogramas individuais dos íons para os íons produtos foram obtidos e a média do tempo de retenção do analito não ultrapassou 5 % de tolerância.

Tanto para os padrões, como para as amostras, as áreas dos picos de DNC foram obtidas a partir do monitoramento seletivo de reações. A partir dos valores das integrações dos picos para o DNC, o íon determinativo representou 100% e foi calculada a abundância do íon confirmatório como um percentual relativo para cada um dos padrões e das amostras. A média dos percentuais da abundância dos íons das soluções padrões foi utilizada, dentro de uma corrida cromatográfica, sendo verificado se o critério de aceitação ± 20 % da média aritmética para as amostras foi atendido.

Na determinação quantitativa, as áreas dos picos para o composto DNC e DNC- d_8 foram obtidas. Um gráfico da curva analítica usando as taxas dos íons *versus* as concentrações foi plotado. A partir da curva, as concentrações foram calculadas para todas as amostras. As concentrações de DNC em massa ($\mu\text{g kg}^{-1}$) foram obtidas conforme a equação (8).

$$\text{Concentração de DNC nos tecidos} = \frac{A \times B}{C} \times D \quad (8),$$

onde A corresponde à concentração da amostra a partir da curva analítica (ng mL^{-1}); B equivale ao volume do extrato (mL); C é a massa da amostra (g); e D é o fator de diluição.

3.3.1.7 Validação do método

Os procedimentos de validação foram conduzidos para obter os parâmetros de desempenho do método analítico como a linearidade, especificidade, exatidão e precisão, de acordo com as recomendações da normativa da Comissão Europeia nº 657/2002. (UNIÃO EUROPEIA, 2002). A linearidade do método foi avaliada por meio de curvas de calibração preparadas na solução da matriz combinadas com padrão interno em seis níveis de

concentração de DNC (0,5; 1,0; 2,5; 10; 25 e 50 ng mL⁻¹) com quatro réplicas. Foi utilizado padrão interno na concentração de 40 µg kg⁻¹. As curvas foram plotadas pela concentração do analito (0 a 500 µg kg⁻¹) no eixo das abcissas *versus* a razão entre as áreas do DNC e DNC-*d*₈ no eixo das ordenadas. A especificidade foi verificada pela avaliação de interferentes no tempo de retenção do analito DNC em cromatogramas de 20 amostras de peito de frango, antes e após a fortificação, obtidas de animais que não receberam nicarbazina, as quais foram consideradas como amostras em branco.

Os parâmetros de desempenho do método, exatidão e precisão, foram obtidos da análise de amostras de peito em branco fortificadas em quatro níveis de contaminação: 0,5; 1,0; 1,5 e 10 vezes o LMR de DNC em peito de frango (100, 200, 400 e 2000 µg kg⁻¹). A exatidão foi obtida por meio de avaliações da recuperação do analito para cada nível de contaminação. Foram avaliadas a precisão pelo cálculo do coeficiente de variação (CV, %) em termos da repetibilidade (intradia) e da reprodutibilidade (interdia), considerando três dias de análise, seis repetições para cada nível de contaminação e dois analistas para execução dos ensaios. (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método foram determinados considerando: LOD = 3,3 σ/S e LOQ: 10 σ/S; onde σ representa o desvio padrão do intercepto da curva e S equivale ao coeficiente angular da curva. (ICH, 2005).

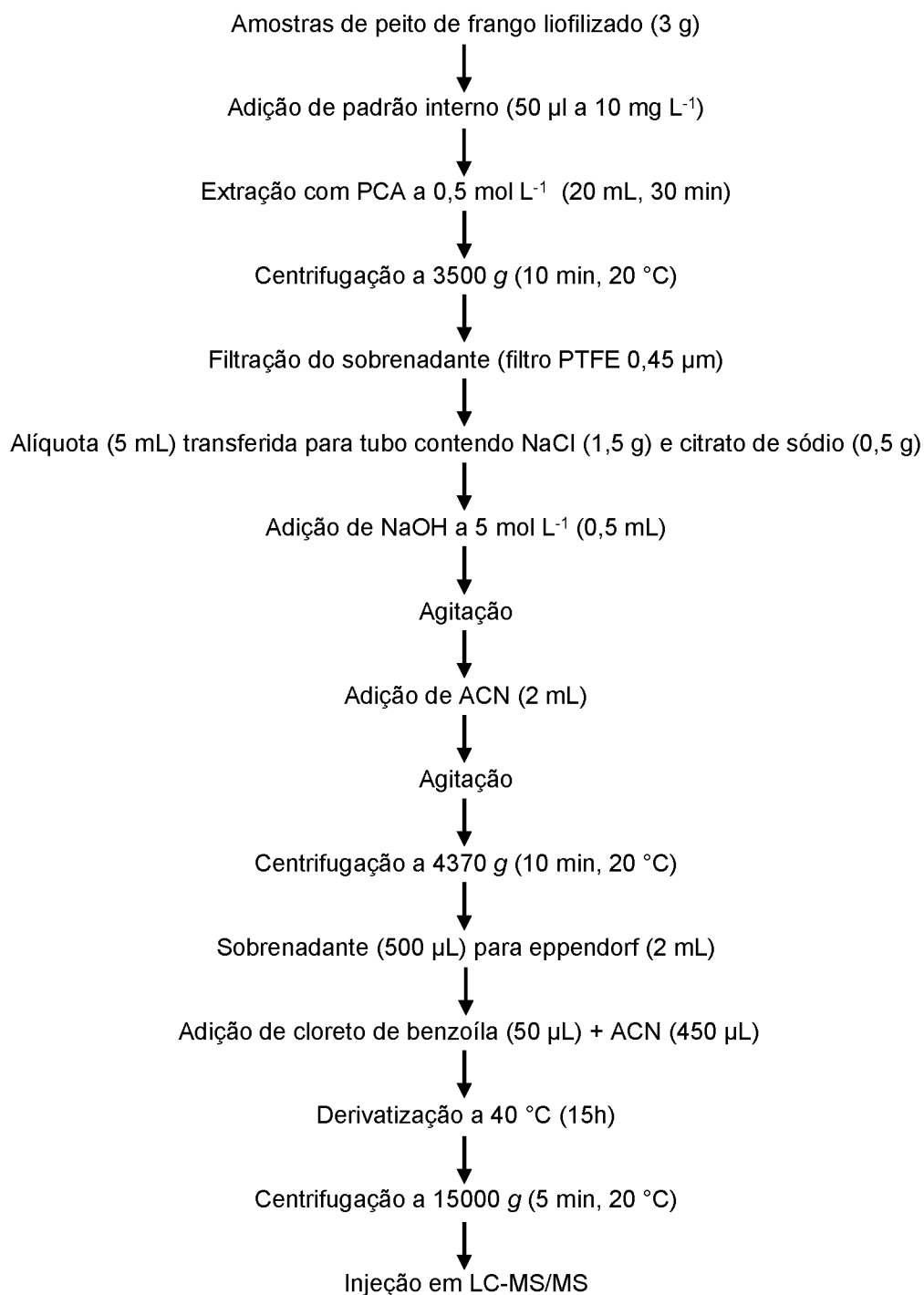
3.3.2 Método para determinação de *p*-NA em peito de frango

Na literatura consultada, não foi encontrado método para determinação do analito *p*-NA em peito de frango. Desta forma, foram necessários o desenvolvimento e a validação de um novo método para a quantificação da *p*-NA nas amostras de peito de frango processadas termicamente e na água de cozimento.

O princípio do método consistiu na moagem das amostras de peito de frango liofilizado, extração com ácido perclórico (PCA), extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE), derivatização e quantificação por LC-MS/MS com uso de curva de calibração preparada na matriz combinada com padrão interno (anilina).

As principais etapas deste método desenvolvido estão descritas no fluxograma da Figura 6 e detalhadas nas subseções a seguir.

FIGURA 6 – ETAPAS DA DETERMINAÇÃO DO ANALITO *p*-NA EM PEITO DE FRANGO



FONTE: O autor (2018).

3.3.2.1 Materiais e Reagentes

Os materiais, equipamentos e reagentes utilizados na determinação de *p*-NA em peito de frango estão apresentados nos Quadros 4 e 5.

QUADRO 4 – MATERIAIS PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO *p*-NA EM PEITO DE FRANGO

Materiais	Características
Micropipetas	Eppendorf Research plus. Part No. 226629Z (20–200 µL), Part No. I36600D (100–1000 µL), Part No. 2759453 (500–5000 µL), Part No. O30298B (1–10 mL)
Balanças analíticas e semi-analíticas	Precisão de 0,01 e 0,00001g
Triturador	Moinho analítico IKA ^R A11 Basic
Misturador vortex	Biomixer Modelo No. QL-901
Agitador de Wagner	Agitação por inversão dos tubos
Tubos de polipropileno	50 mL, cônico, com tampa
Vials para HPLC	Analítica, 2,0 mL
Filtros de seringa	Nylon hidrofílico, 33 mm, poro 0,45 µm
Centrífugas	IEC, DPR6000, 6000 rpm, refrigerada SOLAB, SL706, 6000 rpm, refrigerada SCI LOGEX, D3024R, 15000 rpm, refrigerada
LC-MS/MS	LC system Surveyor Plus da Thermo Triplo-quadrupolo Quantum Access Max da Thermo
Coluna cromatográfica	C18 100A (partícula 5 µm) 4,6 x 100 mm
Liofilizador	JJ Científica LJI-030
Moinho analítico	IKA A11 Basic

FONTE: O autor (2018).

QUADRO 5 - REAGENTES PARA DETERMINAÇÃO DO ANALITO *p*-NA EM PEITO DE FRANGO

(continua)

Reagentes	Características
Água (H ₂ O)	Água deionizada
Acetonitrila (ACN)	Grau HPLC Merck
Cloreto de Sódio (NaCl)	Certificado ACS
Citrato de Sódio dihidratado	Certificado ACS
Ácido Fórmico (FA)	Certificado ACS

FONTE: O autor (2018).

(conclusão)

Reagentes	Características
Padrão analítico de <i>p</i> -NA	Sigma-Aldrich Part No. 18513, pureza > 99%, Lote BCBR3311V
Padrão interno anilina	Sigma-Aldrich Part No. 242284, pureza > 99,5%, Lote STBH5612
Cloreto de Benzoíla	Sigma-Aldrich Part No. 259950, pureza 99%, Lote SHBC8811V
Ácido Perclórico	Certificado ACS

FONTE: O autor (2018).

3.3.2.2 Preparo de soluções

As soluções do analito *p*-NA e do padrão interno foram preparadas conforme descrito a seguir.

1. Solução estoque de *p*-NA a 1000 mg L⁻¹: em balão volumétrico de 100 mL, foram dissolvidos 103,0 mg de padrão analítico de *p*-NA em acetonitrila usando ultrassom;
2. Solução intermediária de *p*-NA a 100 mg L⁻¹: em tubo de Falcon de 50 mL, foram diluídos 1,0 mL da solução estoque a 1000 mg L⁻¹ com 9,0 mL de acetonitrila;
3. Solução intermediária de *p*-NA a 10 mg L⁻¹: em tubo de Falcon de 50 mL, foram diluídos 1,0 mL da solução intermediária a 100 mg L⁻¹ com 9,0 mL de acetonitrila;
4. Solução estoque de padrão interno de anilina a 1000 mg L⁻¹: em balão volumétrico de 100 mL, foram dissolvidos 103 mg de padrão analítico de anilina da Sigma Aldrich em acetonitrila usando ultrassom. A solução foi transferida para tubo de Falcon protegido da luz e armazenada sob refrigeração (0-4 °C);
5. Soluções de padrão interno de anilina a 100 e 10 mg L⁻¹: foram preparadas de forma similar aos itens 2 e 3;
6. Solução de ácido perclórico (0,5 mol L⁻¹): em balão volumétrico de 200 mL, foram diluídos 8,7 mL de PCA concentrado (70–72%) em água ultra-pura.

7. Solução de neutralização (hidróxido de sódio a 5 mol L⁻¹): em balão volumétrico de 500 mL, foram dissolvidos 100 g de NaOH em água ultrapura;
8. Solução de derivatizante de cloreto de benzoíla a 2% (v/v): em *vial* de 15 mL, foram diluídos 200 µL de cloreto de benzoíla com 10 mL de acetonitrila;

Todas as soluções foram protegidas da luz e armazenadas a -20 °C.

3.3.2.3 Preparo das amostras

As amostras de peito de frango foram preparadas por liofilização, conforme descrito na seção 3.3.1.3.

3.3.2.4 Extração

Em tubo de Falcon de 50 mL, foram pesadas 3 g da amostra de peito de frango liofilizada e moída (equivalente a 10 g na base úmida). Inicialmente, foram adicionados 50 µL da solução de padrão interno de anilina (10 mg L⁻¹). O volume de 20 mL de PCA 0,5 M foi adicionado e a suspensão foi agitada em vortex por 30 s. Em seguida, o tubo foi agitado por inversão em agitador de Wagner por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 3500 x *g* por 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi filtrado (membrana hidrofílica de nylon, 33 mm, 0,45 µm), e coletado em outro tubo de 50 mL para uso nas etapas de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* e da derivatização.

3.3.2.5 Extração líquido-líquido assistida por *salting-out* e derivatização

Os extratos das amostras de peito de frango foram submetidos ao procedimento de extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE). Inicialmente, foram transferidos 5 mL do filtrado para tubo de Falcon de 15 mL contendo 1,5 g de NaCl e 0,5 g de citrato de sódio dihidratado. Em seguida, 0,5 mL de solução de NaOH 5 mol L⁻¹ foram adicionados. A mistura foi agitada vigorosamente para promover a dissolução dos sais. Foram adicionados 2 mL de acetonitrila e a solução foi agitada novamente para a partição líquido-líquido. A mistura foi centrifugada a 4370 x *g* por 10 minutos a 20 °C para promover a

separação das fases líquidas. Uma alíquota da fase orgânica (superior) foi direcionada para o procedimento de derivatização.

Foram transferidos 500 µL da fase orgânica obtida por SALLE para Eppendorf de 2 mL, contendo 50 µL do derivatizante (cloreto de benzoíla) e 450 µL de acetonitrila. Para a etapa de derivatização, a solução foi incubada em estufa a 40 °C por no mínimo 15 h (*overnight*). Após este período, foi realizada centrifugação a 15000 x *g* por 5 minutos a 20 °C. O volume de 700 µL do sobrenadante foi transferido para *vial* de 2 mL.

3.3.2.6 Preparo da curva de calibração na solução da matriz combinada com padrão interno

A curva analítica foi preparada pela combinação da solução do extrato da matriz com quantidades conhecidas do analito *p*-NA e com o padrão interno anilina. Foram obtidos seis pontos de calibração.

Para a matriz peito de frango, foram pesados $2,5 \pm 0,20$ g da amostra liofilizada e moída em tubos de Falcon de 50 mL. Foram adicionados à amostra de peito de frango liofilizada: a *p*-NA e a anilina, previamente ao procedimento de extração. Foram adicionados 50 µL de padrão interno a 10 mg L⁻¹ em todas as amostras. Para a obtenção das concentrações de *p*-NA a 100; 500; 1000; 1500; 2000 e 2500 ng g⁻¹, foram adicionadas 100 µL da solução de *p*-NA a 10 mg L⁻¹, 50, 100, 150, 200 e 250 µL da solução de *p*-NA a 100 mg L⁻¹, respectivamente. Após a adição das soluções à matriz, as etapas finais do procedimento de determinação do analito foram continuadas.

3.3.2.7 Método de quantificação do analito *p*-NA por LC-MS/MS

A análise foi conduzida usando um LC system *Surveyor Plus* (Thermo, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo *Quantum Access Max* (Thermo, EUA). As separações foram realizadas em uma coluna analítica *Kinetex C18 100A* (100 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de poro, *Phenomenex*) combinada com uma pré-coluna C18 (*SecurityGuard™ Ultra*, *Phenomenex*). Volume de injeção: 10 µL. Temperatura da coluna: 30 °C. Uma combinação de duas fases móveis (A e B) foi utilizada com uma taxa de fluxo

constante de 1,0 mL min⁻¹. Fase móvel A: água com 0,1% de ácido fórmico (v/v). Fase móvel B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (v/v). As separações foram obtidas em modo gradiente conforme descrito a seguir: 95% A (0–0,5 min), 30% A (0,5–6 min, mantidos até 10 min), e 100% B (10–12 min, mantidos até 13,5 min), 95% A (13,5–15 min). A proporção da fase móvel foi alterada linearmente para cada rampa, sendo todos compostos eluídos da coluna dentro de 15 min.

O espectrômetro de massas foi equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operado em modo de ionização positivo (ESI⁺), com monitoramento seletivo de reações (SRM). Primeiramente, foi realizada a infusão direta de soluções-padrão de cada anilina derivatizada (10 mg L⁻¹) por meio de um sistema integrado de seringa e bomba de infusão no fluxo de 10 µL min⁻¹ para ajustar o MS e identificar o íon precursor, íons-produto, potencial ótimo na fonte de íons e a energia de colisão ideal. Para a *p*-NA derivatizada, o íon precursor selecionado foi o íon molecular [M+H]⁺ de *m/z* 242,9 com os íons produto de *m/z* 105,2 (19 eV de energia de colisão) e *m/z* 77,3 (35 eV de energia de colisão) para as transições determinativa e confirmatória, respectivamente. Para a anilina (IS) derivatizada, o íon molecular [M+H]⁺ de *m/z* 198,0 foi selecionado como íon precursor, tendo com íons produto os fragmentos de *m/z* 105,2 (19 eV de energia de colisão) para quantificação e *m/z* 77,3 (35 eV de energia de colisão) para confirmação. O tempo de retenção também foi utilizado para a confirmação do analito. Por infusão direta da mesma solução-padrão derivatizada com 1 mL min⁻¹ da fase móvel (água: acetonitrila 50:50 com 0,1% de ácido fórmico), as condições do MS foram otimizadas para: potencial na fonte de íons de 3000 V; temperatura de vaporização de 348 °C; temperatura do capilar de 350 °C, pressão do gás de bainha de 50 psi; pressão do gás auxiliar de 45 psi. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador e argônio como gás de colisão na pressão de 1,9 mTorr. Os dados obtidos foram processados em *software* XcaliburTM 2.1. A concentração do analito foi expressa em ng g⁻¹.

3.3.2.8 Detecção de *p*-NA em água de cozimento do peito de frango

Para a detecção do analito *p*-NA nas amostras de água de cozimento obtidas a partir do peito de frango processado termicamente, foi utilizado o mesmo método desenvolvido para a matriz peito de frango. No entanto, não

houve a necessidade da extração do analito com ácido perclórico, pois o mesmo já se encontrava em solução aquosa. As demais etapas foram realizadas, conforme descrito anteriormente, sendo as amostras de água previamente filtradas.

A curva analítica foi obtida nas concentrações de *p*-NA a 50; 500; 100; 200; 300; 400 e 500 ng mL⁻¹.

3.3.2.9 Validação do método

Durante o desenvolvimento do método para quantificação de *p*-NA, foi realizada a adição de DNC (100 µL da solução a 100 µg mL⁻¹) nas amostras de peito de frango controle (branco). O objetivo foi verificar se durante o uso do método de determinação do analito *p*-NA poderia ocorrer a degradação de DNC presente nas amostras gerando *p*-NA. Foram avaliadas 7 amostras de peito de frango em branco fortificadas com DNC para cada dia de validação.

A validação do novo método foi conduzida para obter os parâmetros de desempenho do método analítico conforme as recomendações da normativa da Comissão Europeia nº 657/2002. (UNIÃO EUROPEIA, 2002). A linearidade do método foi avaliada por meio de curvas de calibração preparadas na solução da matriz combinadas com padrão interno em seis níveis de concentração de *p*-NA (100; 500; 1000; 1500; 2000 e 2500 ng g⁻¹) com três réplicas. Foi utilizado padrão interno (anilina) na concentração de 500 ng g⁻¹. As curvas foram plotadas pela concentração do analito no eixo das abscissas *versus* a razão entre as áreas de *p*-NA e anilina no eixo das ordenadas. A especificidade foi verificada pela avaliação de interferentes no tempo de retenção da *p*-NA em cromatogramas de amostras de peito de frango, antes e após a fortificação.

Os parâmetros de desempenho do método, exatidão e precisão, foram obtidos da análise de amostras de peito em branco fortificadas em quatro níveis de contaminação: 200, 500, 1000 e 2000 ng g⁻¹. A exatidão foi obtida por meio de avaliações da recuperação do analito para cada nível de contaminação. Foram avaliadas a precisão pelo cálculo do coeficiente de variação (CV, %) em termos da repetibilidade (intradia) e da reprodutibilidade (interdia), considerando três dias de análise, seis repetições para cada nível de contaminação e dois

analistas para execução dos ensaios. (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método foram determinados considerando a relação sinal-ruído (S/R): LOD = 3 S/R e LOQ = 10 S/R. (ICH, 2005).

3.3.3 Obtenção das amostras de peito de frango contendo DNC

A criação dos frangos de corte conduzida neste estudo foi autorizada pelo Comitê de Ética (CEUA) e pela Comissão de Biosseguridade (COMBIO) da Embrapa Suínos e Aves, obtendo, respectivamente, os registros de aprovação nº 013/2016 e nº 009/2017 (Apêndices 1 e 2).

Foram utilizadas poedeiras da linhagem TT da Embrapa que realizaram a postura de ovos, os quais foram incubados em condições controladas para produzir frangos de corte. Após 21 dias, os ovos eclodiram e os pintainhos, tanto do sexo masculino quanto feminino, foram alojados de forma coletiva em boxes com cama de cepilho de madeira. Os frangos de corte foram alimentados *ad libitum* com ração contendo nicarbazina (180 mg kg⁻¹ de ração), conforme recomendação da FDA. A nicarbazina não foi retirada da ração antes do abate para assegurar sua deposição nos tecidos. A formulação das dietas foi baseada em Rostagno et al. (2011), visando atender as exigências nutricionais de cada fase de criação (1–21, 21–35, e 35–42 dias de idade). O Apêndice 3 contempla a composição das rações por período de criação das aves.

A criação de frangos de corte foi conduzida para uso das amostras de peito de frango em 2 experimentos envolvendo tratamento térmico. O primeiro consistiu na criação de 30 frangos para o uso das amostras de peito de frango no experimento 1. As aves foram produzidas em diferentes lotes, totalizando 5 grupos (A–E), e gerando 6 amostras de peitos de frango para cada grupo. Para o experimento 2, foi criado somente um lote de frangos de corte, o grupo F, contendo 12 aves, gerando, conseqüentemente, 12 amostras de peito de frango.

Aos 42 dias de idade, os frangos foram sacrificados por deslocamento cervical com coleta imediata do peito de frango (músculo *Pectoralis major*), sem pele. Todas as amostras foram armazenadas a 4 °C e subsequentemente submetidas ao processamento térmico.

3.3.4 Tratamentos térmicos

3.3.4.1 Experimento 1

Este experimento foi conduzido para avaliar o efeito dos tratamentos térmicos no conteúdo de DNC em peito de frango ao longo do tempo de aquecimento. Para o delineamento experimental, foi utilizado um quadrado latino 6 x 6 (6 frangos x 6 posições de coleta no peito) para cada um dos seguintes métodos convencionais de preparo da carne de frango: cozimento em água, grelha, micro-ondas, fritura e forneamento.

Nos delineamentos em quadrado latino, os tratamentos são colocados em linhas e colunas. Cada coluna contempla todos os tratamentos, assim como acontece em cada linha. Para isso, deve-se ter o mesmo número de linhas, colunas e de tratamentos adotados. Desta forma, o número de repetições escolhido também deve ser igual a quantidade de tratamentos. Os quadrados latinos são usados para eliminar a heterogeneidade das amostras, o que é muito comum quando se envolve ensaio com animais. (PIMENTEL-GOMES, 2009).

Neste estudo, no delineamento em quadrado latino, os frangos e a posição no peito foram considerados como fatores de restrição de casualização. O tempo de tratamento térmico foi considerado como fator de estudo. Este delineamento foi conduzido para considerar a possível variabilidade da concentração de DNC entre frangos e entre posições do mesmo peito. Um exemplo de quadrado latino adotado está apresentado na Tabela 11.

TABELA 11 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS AO LONGO DO TEMPO

Frango	Posição					
	1	2	3	4	5	6
1	t 0	t 1	t 2	t 3	t 4	t 5
2	t 1	t 2	t 3	t 4	t 5	t 0
3	t 2	t 3	t 4	t 5	t 0	t 1
4	t 3	t 4	t 5	t 0	t 1	t 2
5	t 4	t 5	t 0	t 1	t 2	t 3
6	t 5	t 0	t 1	t 2	t 3	t 4

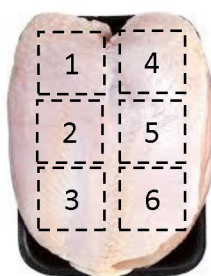
FONTE: O autor (2017).

NOTA: t 0 refere-se ao tempo sem cozimento (porção crua); e t 1 a t 5 referem-se aos tempos de tratamento térmico.

Um total de 30 frangos (grupos A–E) foram usados neste experimento. Os peitos de frango de um grupo ($n=6$) foram submetidos ao mesmo método de

processamento térmico (grupo A: cozimento, grupo B: grelha; grupo C: micro-ondas; grupo D: fritura; grupo E: forneamento). Cada peito de frango foi dividido em 6 porções (50–60 g cada), conforme a Figura 7, então cada uma destas porções, individualmente, foi sorteada ao acaso e designada a um tempo específico de um método de tratamento térmico. Uma dessas partes foi separada para obter a concentração inicial de DNC na amostra crua (tempo zero). Desta forma, um total de 36 porções por método de tratamento térmico foram obtidas.

FIGURA 7 – POSIÇÕES DE FRACIONAMENTO DO PEITO DE FRANGO



FONTE: O autor (2017).

As porções de peito de frango foram pesadas e submetidas aos métodos de cozimento, conforme descrito na seção 3.3.4.3. Em um procedimento de cozimento, porções de um mesmo peito foram preparadas simultaneamente e coletadas nos tempos de aquecimento definidos: cozimento durante 5, 10, 15, 20 e 25 min; grelha a 15, 30, 45, 60 e 75 min (a porção foi reposicionada quando completou 30 min na grelha para cozimento do outro lado); micro-ondas a 1, 2, 3, 4 e 5 min; fritura a 5, 10, 15, 20 e 25 min; e forneamento a 15, 30, 45, 60 e 75 min. Estes períodos de tempo foram estabelecidos em ensaios prévios considerando as amostras cozidas quando a temperatura no centro geométrico das mesmas atingiu 70 °C. Este valor foi assumido como a temperatura de cozimento. (BRASIL, 2004a). Após cada método de preparo, as porções cozidas foram colocadas sob refrigeração (0-4 °C) a fim de reduzir a temperatura e parar as reações. As suas massas também foram determinadas.

3.3.4.2 Experimento 2

No experimento 1, não foi possível comparar os tratamentos térmicos, pois os frangos foram criados em lotes diferentes. Por isso, as amostras do

experimento 2 foram utilizadas para avaliar a eficiência dos tratamentos térmicos na degradação de DNC em peito de frango.

Assim como no experimento 1, foi utilizado um delineamento em quadrado latino 6 x 6 (6 frangos x 6 posições de coleta no peito), conforme a Tabela 12. Neste caso, 12 frangos (grupo F, $n=12$). As amostras de peito de frango foram divididas em 6 porções (um total de 72 porções de 50–60 g), e cada uma destas foi destinada ao acaso a um dos cinco métodos de cozimento selecionados, enquanto que uma destas porções foi separada para obter a concentração de DNC na carne crua.

TABELA 12 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS

Frango	Posição					
	1	2	3	4	5	6
1	T3	T2	T5	T4	T6	T1
2	T4	T6	T3	T5	T1	T2
3	T2	T3	T1	T6	T4	T5
4	T6	T4	T2	T1	T5	T3
5	T5	T1	T4	T3	T2	T6
6	T1	T5	T6	T2	T3	T4

FONTE: O autor (2017).

NOTA: T1 equivale ao cozimento em água; T2 a grelha; T3 ao micro-ondas; T4 a fritura; T5 ao forneamento e T6 a porção sem tratamento térmico.

As porções foram pesadas e submetidas aos métodos de preparo da carne, conforme descrito na seção 3.3.4.3. Em um procedimento de tratamento térmico, porções foram preparadas simultaneamente e coletadas em um tempo de aquecimento definido: cozimento a 15 min; grelha a 60 min (a porção foi invertida quando completou 30 min na grelha); micro-ondas a 4 min; fritura a 15 min; e forneamento a 45 min. Com base nos dados de temperatura do experimento 1, fixou-se os tempos para o experimento 2. Os tempos de tratamento térmico escolhidos para cada um dos métodos de preparo da carne foram aqueles que garantiram o alcance da temperatura de cozimento. (BRASIL, 2004a). Após cada procedimento, as porções cozidas foram colocadas sob refrigeração (0–4 °C). As massas das porções também foram determinadas.

3.3.4.3 Aplicação dos tratamentos térmicos em carne de frango contendo DNC

Os procedimentos de tratamento térmico da carne de frango foram conduzidos a fim de simular práticas de preparo convencionais.

Cozimento em água (T1): uma chapa de aquecimento foi pré-aquecida por no mínimo 1 h. Foram pesados seis copos de Becker de 500 mL e a massa foi registrada. Foram adicionados 200 mL de água em cada um desses copos e a massa do conjunto foi registrada. Os copos de Becker foram colocados sobre a chapa de aquecimento e a temperatura da água foi monitorada. Ao se observar a ebulição da água, a porção do peito de frango foi adicionada, a qual permaneceu sob cozimento até os tempos pré-definidos.

Grelha (T2): em uma capela de exaustão, uma grelha elétrica foi pré-aquecida por no mínimo 30 min até a temperatura da superfície da grelha alcançar 150 °C, monitorada com termômetro tipo espeto (*Tel-Tru Manufacturing Co*, Rochester, EUA). Foram adicionados 500 mL de água à bandeja da grelha e a cada 5 min o nível de água foi monitorado e ajustado quando necessário. A temperatura da superfície da grelha foi monitorada ao longo do experimento. As porções de peito de frango foram posicionadas na grelha e permaneceram até os tempos pré-definidos.

Micro-ondas (T3): foram pesadas seis placas de Petri e a massa foi registrada. As porções de peito de frango foram acomodadas sobre as placas e então posicionadas no interior do micro-ondas (Brastemp, 30 L, 2450 MHz, 1400 W). A potência foi ajustada para 50 % (700 W) do valor nominal. As porções permaneceram sob aquecimento até completar os tempos estabelecidos.

Fritura (T4): foram pesados seis copos de Becker de 500 mL e a massa foi registrada. Foram vertidos 200 mL de óleo em cada um dos copos de Becker e a massa do conjunto foi registrada. Os copos de Becker foram posicionados sobre a chapa de aquecimento (pré-aquecida por 1 h), em uma capela de exaustão, e a temperatura do óleo foi monitorada. Quando o óleo atingiu 200 °C, as porções de peito de frango foram adicionadas, sendo coletadas nos tempos pré-definidos.

Forneamento (T5): um forno elétrico (Britânia, 10 L, 800 W) foi pré-aquecido a 180 °C por no mínimo 30 min. Seis placas de alumínio foram pesadas e as suas massas registradas. As porções de peito de frango foram acomodadas sobre as placas, as quais foram posicionadas no interior do forno. As porções de peito foram coletadas nos tempos definidos.

As temperaturas das porções de peito de frango foram monitoradas com termômetros tipo espeto, antes e após a aplicação dos tratamentos térmicos.

3.3.4.4 Determinação dos analitos DNC e *p*-NA

Um total de 288 amostras foram obtidas dos experimentos 1 e 2. Estas foram preparadas por liofilização conforme seção 3.3.1.3. As análises para quantificação dos analitos foram realizadas em duplicata. As amostras de peito de frango tiveram o analito DNC determinado (576 análises), seguindo as etapas do método validado na seção 3.3.1. Para a determinação do analito *p*-NA na matriz peito de frango (576 análises) e na água de cozimento (96 análises), foram adotadas as etapas do método desenvolvido e validado, apresentado na seção 3.3.2.

Quando necessário, as amostras extraídas foram diluídas com extrato do peito em branco. Na determinação de DNC, a cada 20 amostras foi preparado um controle de qualidade (QC) do método, no nível de fortificação a 200 µg kg⁻¹. No caso da determinação do analito *p*-NA, as amostras fortificadas no nível de 500 µg kg⁻¹ foram utilizadas em cada lote como QC do método.

3.3.5 Degradação do resíduo DNC

Inicialmente, a degradação do resíduo DNC nas amostras de peito de frango foi calculada por meio da equação (9), sendo expressa em percentual de redução da massa absoluta de DNC.

$$\text{Degradação DNC (\%)} = \frac{(m_i \times \text{DNC}_i) - (m_f \times \text{DNC}_f)}{(m_i \times \text{DNC}_i)} \times 100 \quad (9)$$

Onde: m_i : massa da amostra de peito de frango antes do tratamento térmico (g);

m_f : massa da amostra de peito de frango após o tratamento térmico (g);

DNC_i : concentração de DNC na amostra antes do tratamento térmico (µg kg⁻¹);

DNC_f : concentração de DNC na amostra após o tratamento térmico (µg kg⁻¹).

3.3.6 Análise Estatística

Para o experimento 1, os dados de degradação de DNC foram submetidos à análise de variância ponderando-se os dados pelo inverso da variância (GIVM) em cada tempo de tratamento térmico. O procedimento GLM do *software* estatístico SAS (SAS INSTITUTE INC, 2012) foi usado para a análise de variância. Foi considerado um delineamento em quadrado latino 6 x 6 (6 frangos x 6 posições de coleta no peito) para cada tratamento. O tempo de tratamento térmico, frangos e posições de coleta no peito foram incluídas como fontes de variação no modelo GIVM. Quando o teste F identificou um efeito significativo ($p < 0,05$) de tempo de processamento térmico, foi realizada análise de regressão por polinômios ortogonais e aplicado o teste F para dois contrastes ortogonais (comparação entre tempo zero vs. demais tempos; e comparação entre os tempos). Quando o teste F apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) para o segundo contraste e quando um efeito de desvio de regressão foi detectado, a análise de regressão foi conduzida por polinômios ortogonais para os tempos de processamento térmico superiores a zero.

Para o experimento 2, os dados de degradação foram analisados por ANOVA usando o procedimento GLM do SAS para um delineamento em quadrado latino 6 x 6 (6 frangos x 6 posições de coleta no peito). Métodos de tratamento térmico, frangos e posições de coleta no peito foram incluídas como fontes de variação no modelo da ANOVA. Na comparação dos tratamentos térmicos, sempre que o teste F detectou efeito significativo ($p < 0,05$) de tratamento térmico, foi conduzida uma comparação múltipla de médias por meio do teste de Tukey. Os dados de perda de massa também foram analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

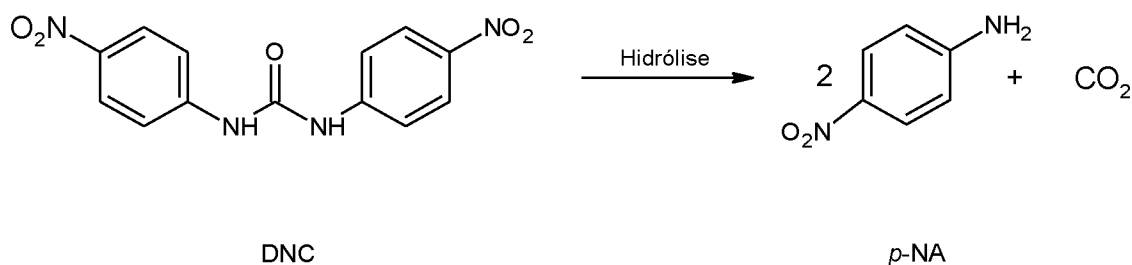
Nesta seção são apresentados os resultados dos ensaios de hidrólise ácida, básica e enzimática da DNC; perfil de decomposição térmica da DNC; validação do método de determinação de DNC e *p*-NA em peito de frango; efeito dos tratamentos térmicos sobre o conteúdo de DNC em peito de frango (experimento 1); da eficiência dos tratamentos térmicos na degradação de DNC na carne de frango (experimento 2); e a identificação e quantificação do produto de degradação da DNC (*p*-NA) em peito de frango.

4.1 EXPERIMENTOS DA HIDRÓLISE DE DNC

4.1.1 Hidrólise ácida e alcalina

Nas condições experimentais adotadas, foi verificado que a DNC foi hidrolisada a 100 °C tanto sob catálise ácida quanto básica. A hidrólise de DNC em soluções aquosas resultou na liberação de *p*-NA (Figura 8), cuja confirmação foi baseada na reação de diazotização. A degradação hidrolítica de DNC em água também foi observada por Tarbin et al. (2005), embora os autores não tenham monitorado o aparecimento da *p*-NA. Tipicamente, fenilureias análogas à DNC sofrem degradação hidrolítica resultando nas aminas derivadas correspondentes (AUDU; HEYN, 1988; LAUDIEN; MITZNER, 2001a,b; SALVESTRINI, et al., 2002).

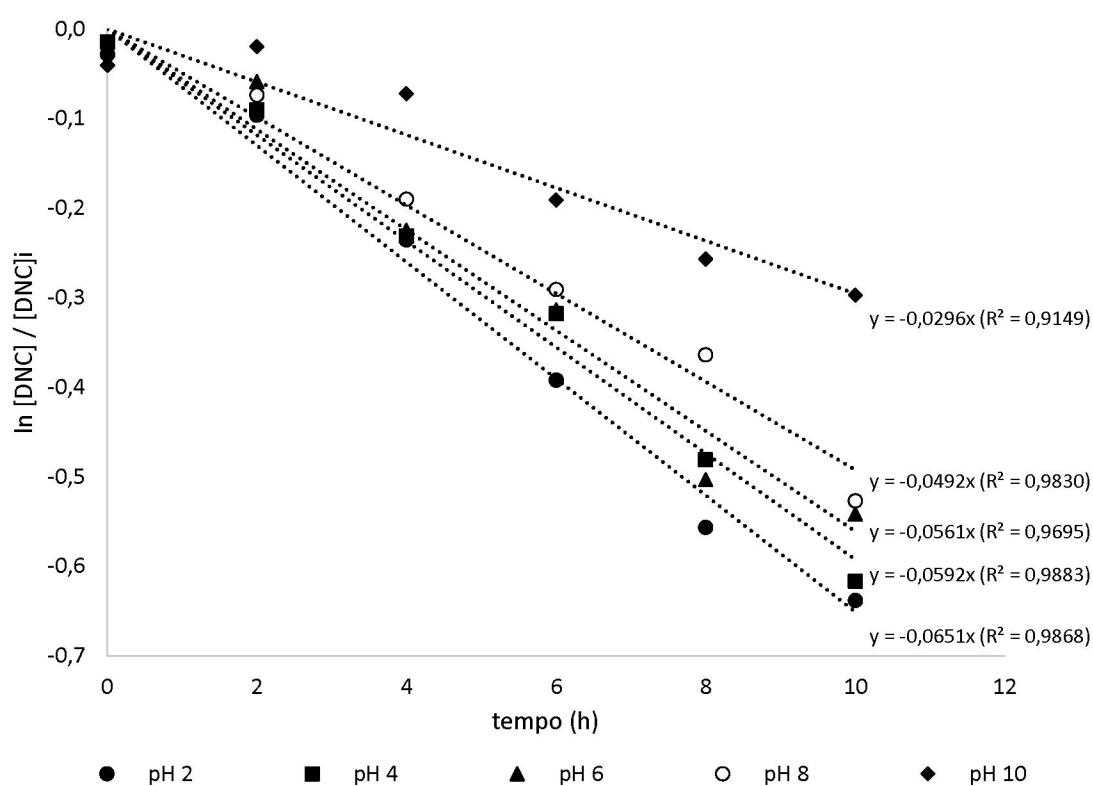
FIGURA 8 – DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DE DNC COM LIBERAÇÃO DE *p*-NA



FONTE: O autor (2017).

Adicionalmente ao objetivo principal deste experimento, foi verificado que a cinética da hidrólise da DNC seguiu um modelo de degradação de pseudo-primeira ordem. A degradação hidrolítica a 100 °C, nas condições testadas, ocorreu lentamente, apresentando as respectivas constantes da taxa de degradação (k'): 0,0651 h⁻¹ em pH 2; 0,0592 h⁻¹ em pH 4; 0,0561 h⁻¹ em pH 6; 0,0492 h⁻¹ em pH 8 e 0,0296 h⁻¹ em pH 10, extraídas do coeficiente angular (valores absolutos) das equações das retas ajustadas da Figura 9.

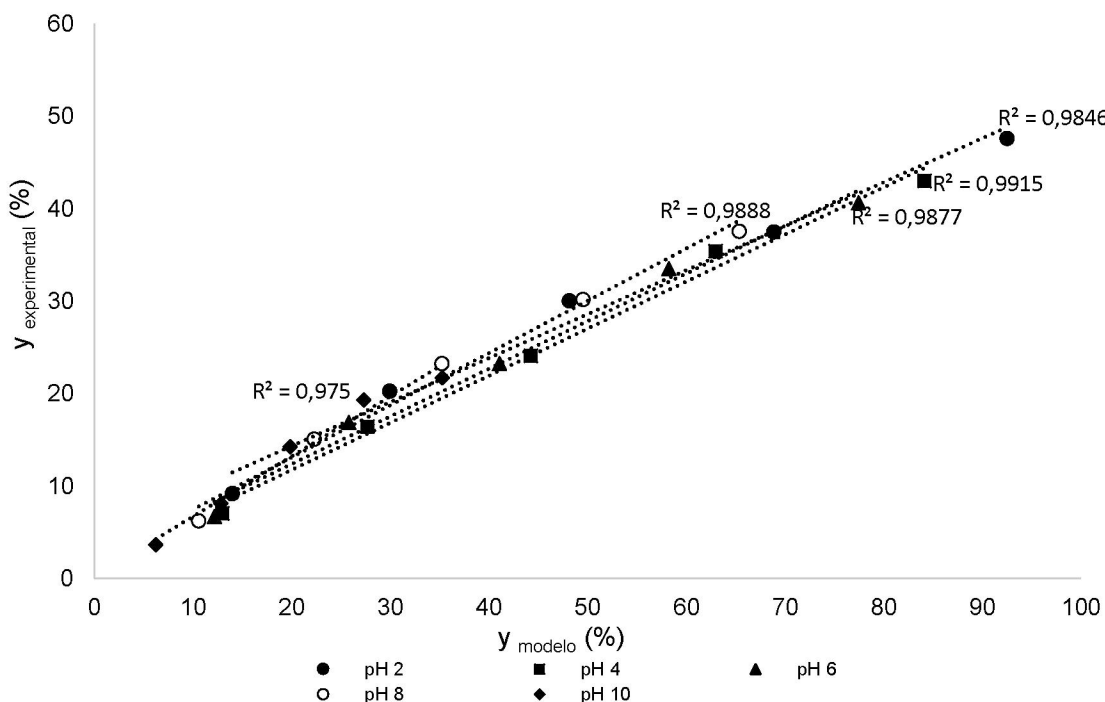
FIGURA 9 – DIMINUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNC, NA TEMPERATURA DE 100 °C, EM FUNÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE EM DIFERENTES NÍVEIS DE pH



FONTE: O autor (2018).

A correlação entre a degradação teórica (y_{modelo}) e a degradação experimental ($y_{\text{experimental}}$) de DNC está apresentada na Figura 10. Os resultados demonstraram a validação do modelo cinético proposto.

FIGURA 10 –COMPARATIVO DA DEGRADAÇÃO DE DNC OBTIDA EXPERIMENTALMENTE VERSUS A DEGRADAÇÃO DE DNC CALCULADA CONSIDERANDO O MODELO CINÉTICO DE PSEUDO-PRIMEIRA ORDEM



FONTE: O autor (2018).

Considerando os resultados dos valores de k' , foi verificado que a velocidade da degradação diminuiu à medida em que o pH aumentou. Esta tendência parece fazer sentido ao se considerar que a hidrólise da DNC pode estar baseada nos mecanismos propostos por Laudien; Mitzner (2001a,b), conforme a Figura 3. Aparentemente, meios alcalinos favorecem a desprotonação da DNC, levando a formação de sua respectiva base conjugada (II), que por sua vez é estabilizada por ressonância, dado o forte efeito sacador de elétrons dos grupos nitro ligados ao anel aromático. Ao se deslocar o equilíbrio no sentido desta base conjugada, a degradação da fenilureia por hidrólise torna-se mais difícil, devido a competição entre os equilíbrios (k_a e k_1). Em consequência do estabelecimento de tal equilíbrio, a velocidade da hidrólise é menor em meios alcalinos quando comparada a catálise ácida. Considerando que a carne de frango possui pH na faixa de 5,0-6,0 (FLETCHER, 1999), existe a possibilidade da ocorrência da hidrólise da DNC.

Os resultados dos experimentos de hidrólise ácida e alcalina em soluções aquosas permitiram obter informação relevante sobre a liberação do

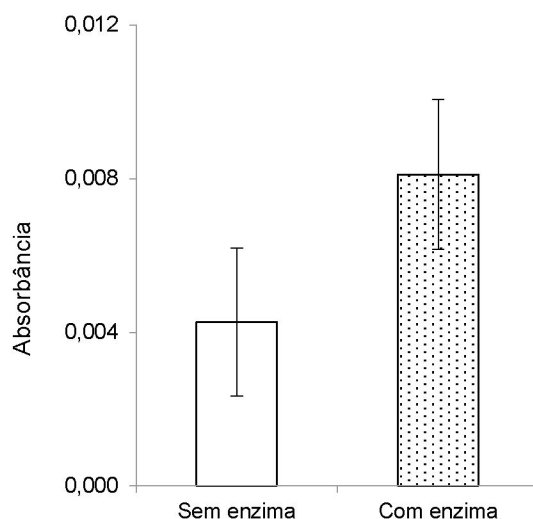
produto de degradação da DNC, a *p*-NA, para posterior investigação deste composto nas amostras de peito de frango contendo DNC e submetidas a tratamento térmico. A degradação hidrolítica da DNC pode ser uma via razoável para explicar a degradação esperada deste resíduo em carne de frango durante o seu processamento térmico, conforme evidenciado por Tarbin et al. (2005).

4.1.2 Hidrólise enzimática

Nos experimentos de hidrólise enzimática, foi verificado no substrato (N-succinil-fenilalanina-*p*-nitroanilida) uma atividade enzimática do extrato do peito de frango de $0,39 \pm 0,10 \text{ U mL}^{-1}$. Após 45 min da incubação do extrato enzimático com o analito DNC e adição dos reagentes, foi verificada a formação do azo composto *p*-NA (a solução adquiriu coloração rosa).

A Figura 11 demonstra a hidrólise de DNC pela atividade das enzimas presentes no peito de frango. Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre a hidrólise realizada na ausência e presença de enzimas. Os resultados evidenciaram a liberação da *p*-NA a partir da hidrólise de DNC, provavelmente, em decorrência da atividade enzimática do extrato do peito de frango.

FIGURA 11 – HIDRÓLISE DE DNC NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EXTRATO ENZIMÁTICO APÓS 45 MIN DE REAÇÃO



FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

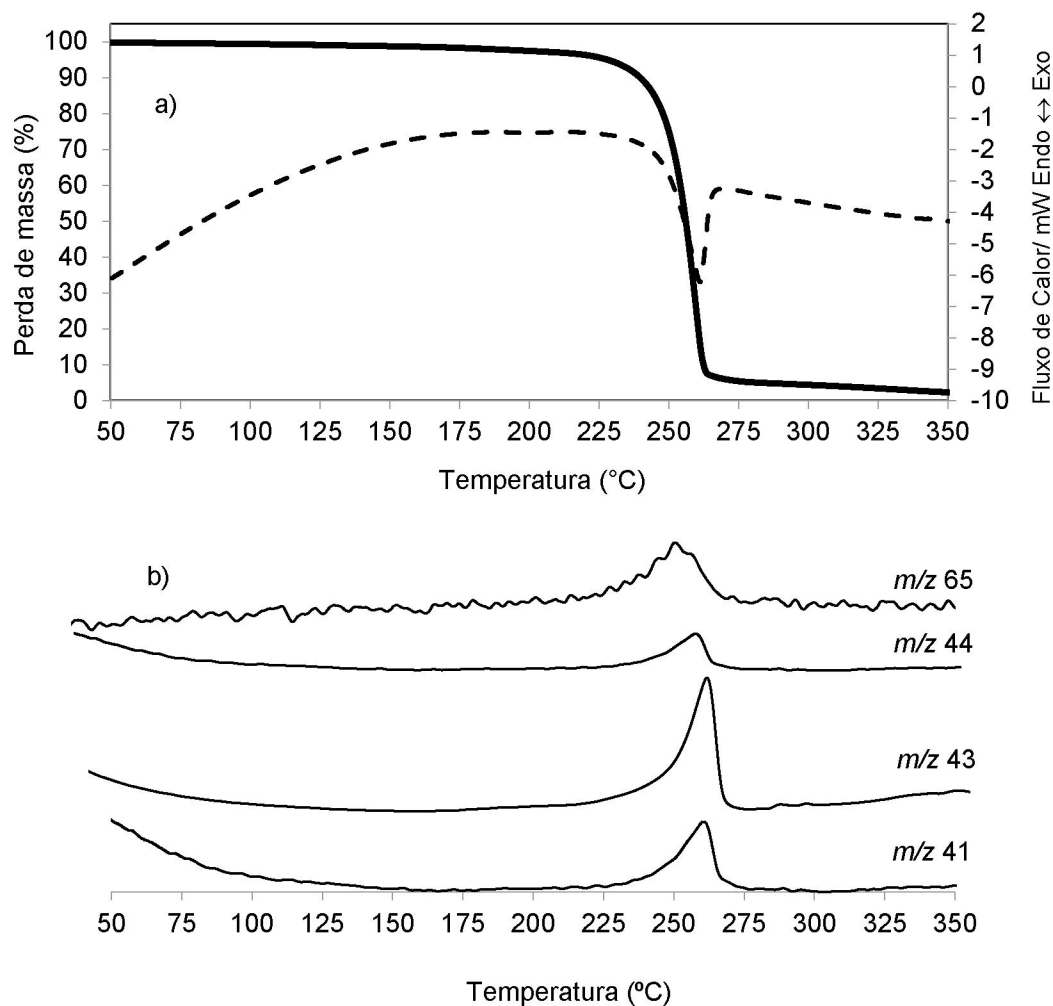
4.2 PERFIL DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DA DNC

As análises térmicas permitiram monitorar as propriedades da DNC em função da temperatura enquanto ocorreu uma variação programada deste parâmetro sob condições de uma atmosfera inerte.

Durante a análise térmica simultânea de TGA-DSC-MS, a curva de TGA da DNC registrou perda de massa em um único evento entre 252–280 °C (Figura 12a). Neste evento, foi totalizada uma perda de massa de 94,4 %, restando 5,6 % de cinzas. A perda de massa foi acompanhada por um evento endotérmico (ΔH de 670 J g⁻¹) registrado simultaneamente na curva da análise de DSC. O pico do evento foi verificado na temperatura de 262 °C (Figura 12a), o qual foi atribuído a decomposição térmica da DNC.

Os principais fragmentos detectados no TG-DSC-MS durante o evento endotérmico foram: m/z 41, 43, 44 e 65 (Figura 12b). A elucidação do fragmento de m/z 41 não foi possível, enquanto que a dos outros fragmentos revelou produtos de degradação coerentes. O fragmento de m/z 43 provavelmente corresponde ao ácido isociânico (HNCO) formado a partir da rápida decomposição de isocianato, como encontrado de maneira similar na decomposição de ureias análogas ao DNC. (BLAKE; IJADI-MAGHSOODI, 1983; STRADELLA; ARGENTERO, 1995; CHEN; ISA, 1998; SCHABER et al., 2004). O fragmento de m/z 44 foi considerado como a liberação de CO₂ no processo de decomposição. Finalmente, o fragmento iônico de m/z 65 foi atribuído a formação de *p*-NA ao comparar os espectros de massas na base de dados (NIST, 2005; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

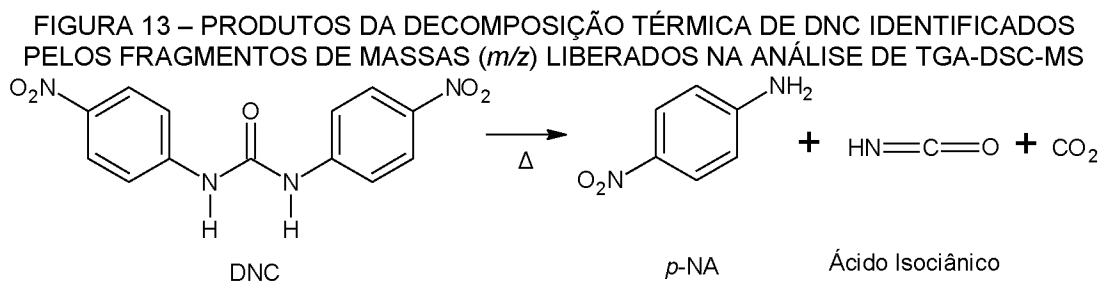
FIGURA 12 – CURVAS DE TGA-DSC DA DNC E FRAGMENTOS DE MASSAS (m/z) LIBERADOS DURANTE A ANÁLISE TÉRMICA SIMULTÂNEA DE TGA-DSC-MS



FONTE: Adaptado de BACILA, D. M. et al. Thermal profile of 4,4'- dinitrocarbanilide determined by simultaneous thermogravimetry-differential scanning calorimetry-mass spectrometry (TG-DSC-MS) and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Py-GC-MS). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p.1-5, 2019.

LEGENDA: a) linha contínua preta representa a curva da análise termogravimétrica (TGA); linha tracejada equivale a curva da análise calorimétrica (DSC); e as demais curvas representam os fragmentos de m/z 65, 44, 43 e 41 monitorados no modo *peak jump* do espectrômetro de massas.

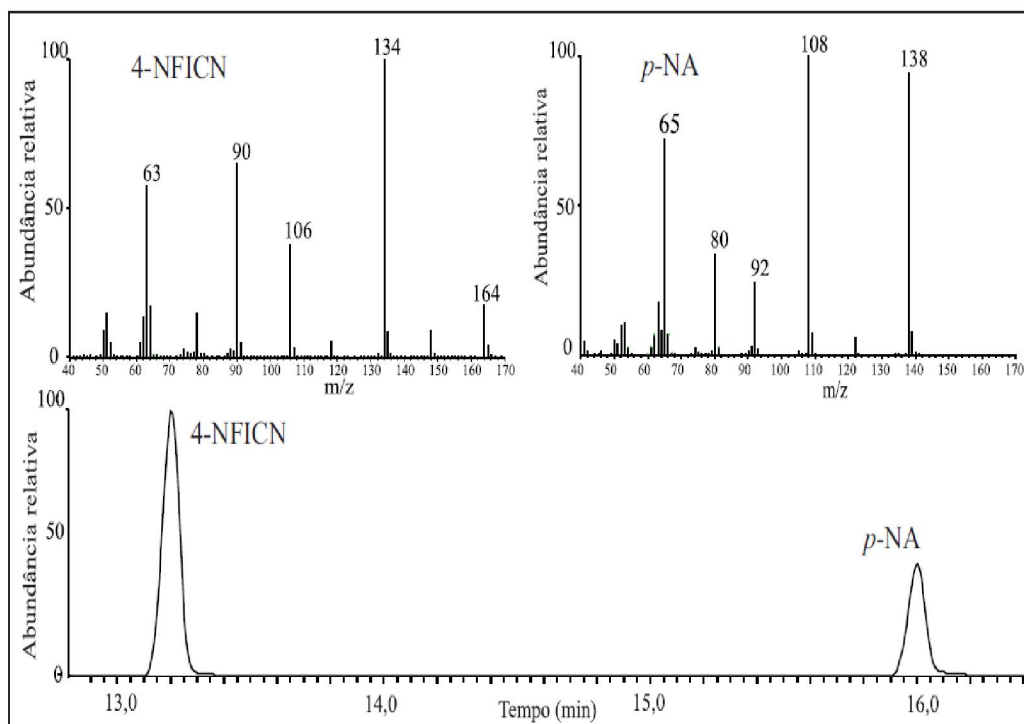
A proposta para os produtos da decomposição térmica identificados pelos fragmentos de massas liberados por meio da análise de TGA-DSC-MS estão detalhados na Figura 13.



FONTE: O autor (2019).

A análise de Py-GC-MS foi conduzida para elucidar os produtos da decomposição térmica de DNC verificados na análise de TGA-DSC-MS. A decomposição a 350 °C gerou dois produtos principais: 4-nitrofenilisocianato (4-NFICN) e *p*-NA (FIGURA 14). Este processo de degradação pode envolver a quebra da ligação da amida com uma migração do hidrogênio, produzindo 4-NFICN e *p*-NA. Esta observação corrobora o resultado de estudo prévio, onde a decomposição de ureia dissubstituída gera isocianato com a respectiva amina (BENNET; SAUNDERS; HARDY, 1953; CARABIAS-MARTÍNEZ, 2003; STRADELLA; ARGENTERO, 1995). O espectro de massas destes compostos é apresentado na Figura 14. O fragmento m/z 65 observado na análise TGA-DSC-MS (atribuído a *p*-NA) foi confirmado por Py-GC-MS. Por outro lado, o fragmento de íon de m/z 63 foi verificado somente na análise de Py-GC-MS. A diferença entre alguns dos fragmentos verificados pode ter ocorrido, pois ambas as técnicas (TGA-DSC-MS x Py-GC-MS) aplicadas neste estudo são distintas com relação à taxa de aquecimento e atmosfera redutora (N_2 x He). Desta forma, a baixa taxa de aquecimento na análise de TGA-DSC-MS (2 °C min⁻¹) pode ter facilitado a degradação de 4-NFICN, e consequentemente foram observados somente a *p*-NA e dióxido de carbono.

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS E ESPECTRO DE MASSAS DOS PRODUTOS DA PIRÓLISE DE DNC A 350 °C

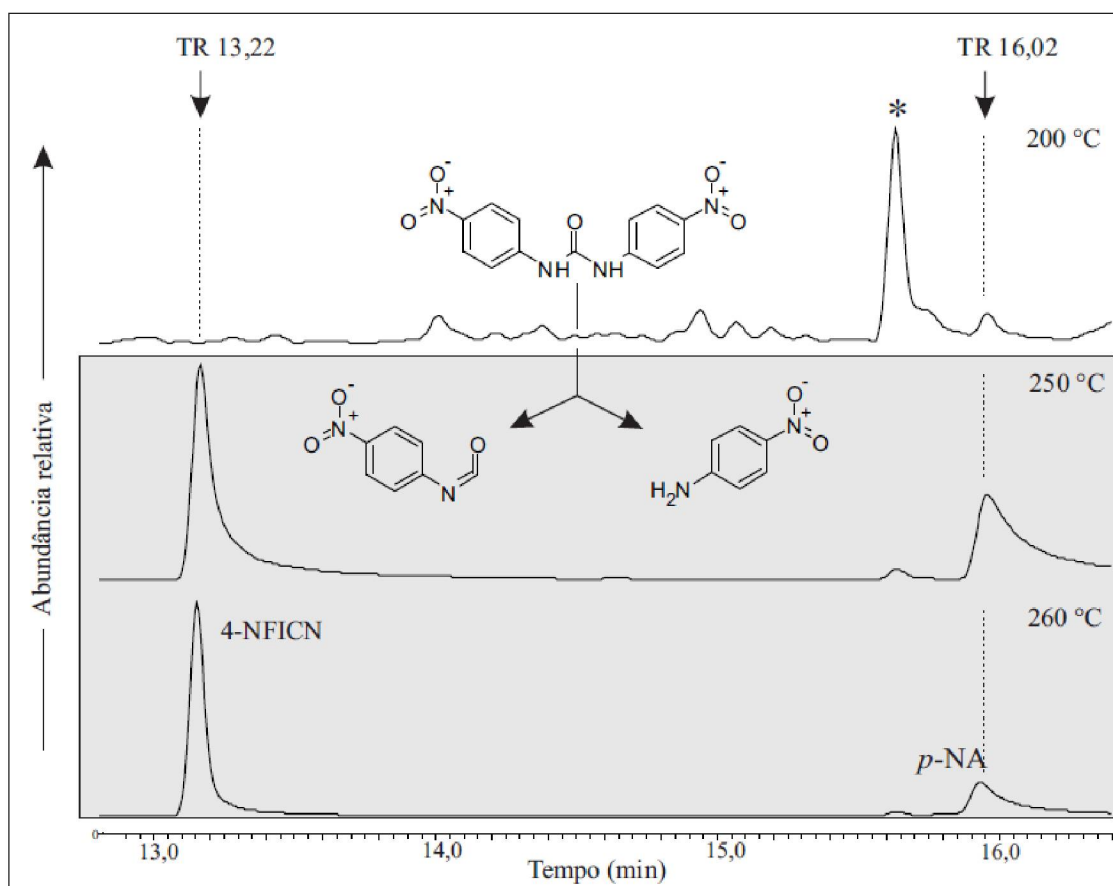


FONTE: Adaptado de BACILA, D. M. et al. Thermal profile of 4,4'- dinitrocarbanilide determined by simultaneous thermogravimetry-differential scanning calorimetry-mass spectrometry (TG-DSC-MS) and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Py-GC-MS). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p.1-5, 2019.

O composto puro DNC foi analisado em diferentes temperaturas de pirólise (200, 250 e 260 °C). Foi verificado que este não se decompõe termicamente por pirólise a 200 °C, mas em temperaturas mais elevadas os seus produtos de degradação foram detectados (FIGURA 15), confirmando as etapas de decomposição térmica registradas na análise de TGA-DSC-MS.

As análises térmicas forneceram resultados importantes a respeito do perfil de decomposição térmica da DNC e a liberação do produto de degradação (*p*-NA). Desta forma, optou-se por investigar a *p*-NA como produto de degradação de interesse da DNC em peito de frango, pois esta foi confirmada em ambas as análises térmicas.

FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS DE DNC EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE PIRÓLISE



FONTE: Adaptado de BACILA, D. M. et al. Thermal profile of 4,4'-dinitrocarbanilide determined by simultaneous thermogravimetry-differential scanning calorimetry-mass spectrometry (TG-DSC-MS) and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Py-GC-MS). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, p.1-5, 2019.

NOTA: * contaminação com ftalato; TR (tempo de retenção).

4.3 INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS NO CONTEÚDO DE DNC EM CARNE DE FRANGO ²

4.3.1 Parâmetros de desempenho do método analítico

4.3.1.1 Determinação do analito DNC em peito de frango

Para determinação e confirmação do analito DNC em carne de frango, foi escolhido o método publicado por Coleman et al. (2014), o qual obteve status de *First Action Official Method* da AOAC. Com objetivo de garantir a qualidade analítica do estudo, os parâmetros de desempenho do método foram determinados, considerando uma abordagem de validação *in-house*.

A especificidade do método foi confirmada por não se verificar picos de interferentes no tempo de retenção do analito de interesse. A linearidade, LOD e LOQ estão apresentados na Tabela 13. O método foi linear na faixa equivalente a 0–500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com um coeficiente de regressão satisfatório ($R^2 > 0,99$). (HARRIS, 2016). O LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) estimado foi aproximadamente 1/10 do LMR do *Codex Alimentarius*, sendo próximo do valor determinado por Coleman et al. (2014). De acordo com a Tabela 14, o método apresentou exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade) satisfatórias e similares aos resultados publicados por Coleman et al. (2014). No geral, os resultados de recuperação atenderam os requisitos recomendados (recuperação de 80–110%) para os níveis de fortificações avaliados. (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Com relação à precisão, os coeficientes de variação não excederam o limite de 15% para repetibilidade inter-dia. Após a confirmação dos requisitos mínimos de validação, o método selecionado foi considerado adequado para uso neste estudo.

TABELA 13 – LINEARIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ) DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO

Referência	Equação de calibração	Linearidade (R^2)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Este estudo	$y = 0,0216x + 0,0021$	0,999	6,1	18,6
Coleman et al. (2014)	-	-	ND	17,7

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Não determinado (ND).

² Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Detection of *p*-nitroaniline released from degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast during thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 32, p. 9002–9008, 2019). Copyright (2019) American Chemical Society.

TABELA 14 – RECUPERAÇÃO DO ANALITO DNC EM PEITO DE FRANGO FORTIFICADO USANDO CURVA DE CALIBRAÇÃO NA SOLUÇÃO DA MATRIZ COMBINADA COM PADRÃO INTERNO

Nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Dia	Este estudo				Coleman et al. (2014)			
		Recu- peração (%)	Intra- dia (CV, %)	Recupe- ração média (%)	Inter- dia (CV, %)	Recu- peração (%)	Intra- dia (CV, %)	Recu- peração média (%)	Inter- dia (CV, %)
100	1	77	10,9	82	11,4	95	0,8	85	10,0
	2	79	11,6			76	5,3		
	3	91	3,0			85	2,2		
200	1	91	3,5	90	5,9	95	1,6	85	19,1
	2	89	3,1			76	7,0		
	3	90	9,6			83	5,9		
400	1	90	3,2	89	4,8	92	4,2	88	4,9
	2	91	6,3			87	4,9		
	3	87	5,0			86	1,9		
2000	1	96	0,9	95	2,0	91	5,0	90	4,5
	2	93	1,4			92	1,8		
	3	95	1,8			86	3,0		

FONTE: O autor (2017).

Ao aplicar o método em amostras reais, QCs fortificados no nível de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram usados em todos os lotes de amostras para monitoramento da qualidade analítica do método. Um total de 28 QCs foram analisados durante a realização deste estudo. A recuperação de DNC foi em média 96% com coeficiente de variação de 5,5%, garantindo uma base de dados confiáveis. Os resultados detalhados dos QCs estão apresentados no Apêndice 5.

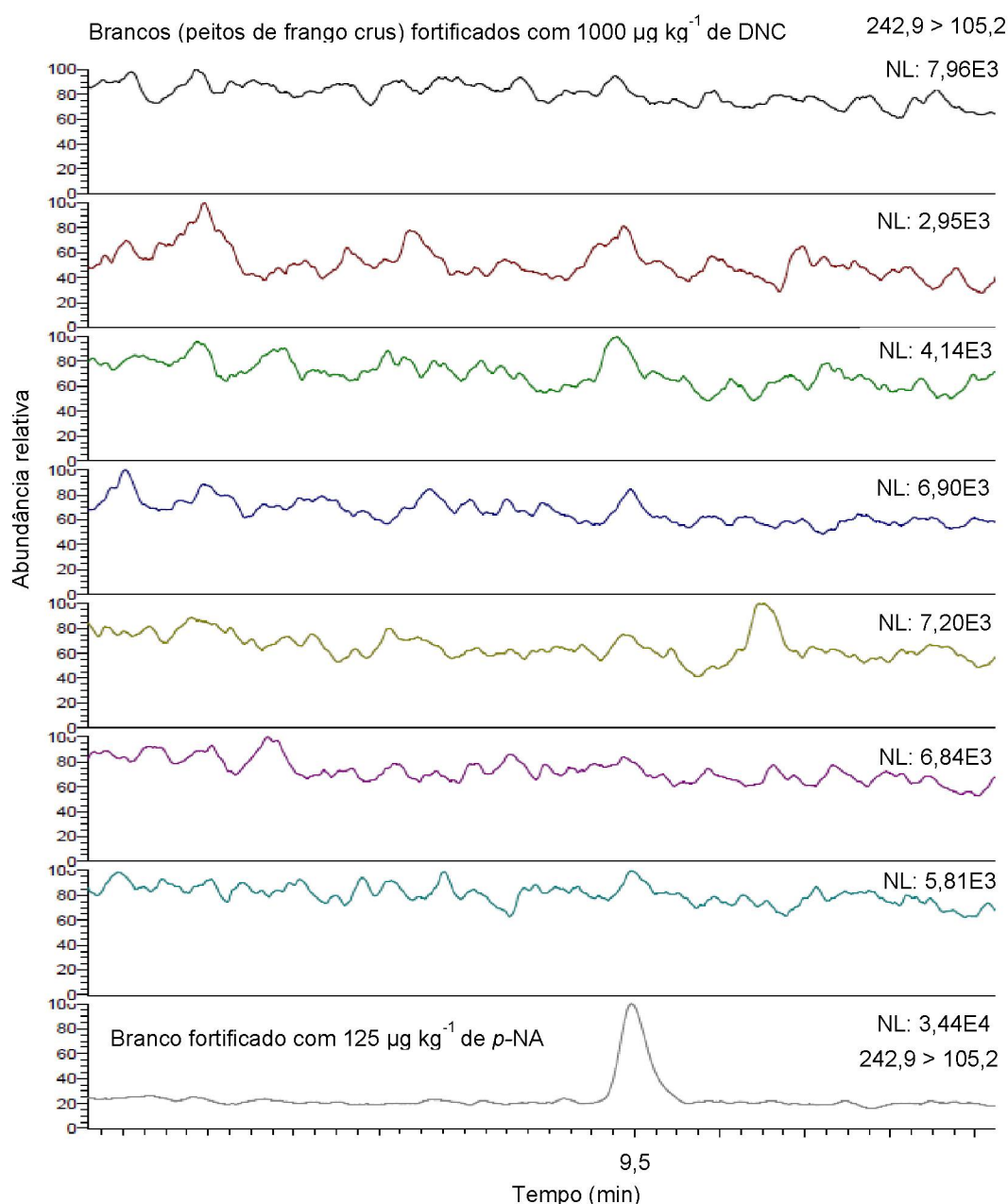
4.3.2.1 Determinação do analito *p*-NA em peito de frango

A *p*-NA foi inicialmente extraída em meio aquoso ácido. Em seguida, o pH foi ajustado para tornar o meio alcalino e assim deixar a amina desprotonada cujo isolamento foi realizado com acetonitrila por SALLE para evitar a troca de solvente. O método para determinação e confirmação de *p*-NA por LC-MS/MS foi baseado na derivatização deste analito com cloreto de benzoíla. Neste caso, a *p*-NA reagiu com o derivatizante para se produzir a respectiva amida.

No decorrer do desenvolvimento do método para quantificação de *p*-NA na matriz peito de frango, foi realizada a adição de DNC nas amostras de peito de frango em branco. Isso foi realizado, pois as amostras geradas nos experimentos contêm DNC e durante a execução do método de determinação da *p*-NA, poderia ocorrer a degradação de DNC gerando *p*-NA e ocasionar, consequentemente, um resultado falso positivo. Na Figura 16 estão

apresentados os cromatogramas de amostras de brancos fortificados com DNC que comprovam a ausência de degradação de DNC pelo método desenvolvido por LC-MS/MS, pois não foi verificada a presença dos fragmentos de íons de m/z 242,9 e de m/z 105,2 da p -NA derivatizada. Além disso, a ionização da p -NA, durante a aplicação do método, ocorreu em modo de ionização positivo, enquanto que o analito DNC somente se ionizaria no modo negativo.

FIGURA 16 – CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE BRANCOS FORTIFICADOS COM DNC OBTIDOS PELO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO ANALITO p -NA



FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Detection of p -nitroaniline released from degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast during thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 32, p. 9002–9008, 2019). Copyright (2019) American Chemical Society.

A linearidade, LOD e LOQ estão apresentados na Tabela 15. O método foi linear na faixa equivalente a 0–2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com um coeficiente de regressão satisfatório ($R^2 > 0,99$). (HARRIS, 2016). No geral, os resultados de recuperação atenderam os requisitos do guia da União Europeia, que estabelece uma recuperação de 80–110% para os níveis de fortificações avaliados. (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Com relação à precisão, os coeficientes de variação não excederam o limite de 15% para repetibilidade inter-dia (Tabela 16).

Ao aplicar o método em amostras reais, QCs fortificados no nível de 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram usados em todos os lotes de amostras para monitoramento da qualidade analítica do método. A recuperação da *p*-NA derivatizada nos QCs foi em média 103%, com coeficiente de variação de 6,9%, garantindo uma base de dados confiável. Os resultados dos QCs estão apresentados no Apêndice 6.

TABELA 15 – LINEARIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ) DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO ANALITO *p*-NA EM PEITO DE FRANGO

Analito	Equação de calibração	Linearidade (R^2)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
<i>p</i> -NA	$y = 0,0625x + 0,0018$	0,9997	10,0	30,0

FONTE: O autor (2018).

TABELA 16 – RECUPERAÇÃO DO ANALITO *p*-NA EM PEITO DE FRANGO FORTIFICADO USANDO CURVA DE CALIBRAÇÃO NA SOLUÇÃO DA MATRIZ COMBINADA COM PADRÃO INTERNO

Nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Dia	Recuperação (%) [*]	Intra-dia (CV, %) [*]	Recuperação (%) [#]	Inter-dia (CV, %) [#]
200	1	103,8	11,0	96,6	9,7
	2	97,1	8,9		
	3	92,7	14,8		
500	1	104,2	7,5	101,2	6,6
	2	100,9	7,5		
	3	98,7	4,2		
1000	1	108,7	8,2	99,1	8,9
	2	93,4	1,9		
	3	97,7	7,5		
2000	1	113,6	10,9	102,2	14,6
	2	89,4	1,8		
	3	102,9	14,8		

FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Detection of *p*-nitroaniline released from degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast during thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 32, p. 9002–9008, 2019). Copyright (2019) American Chemical Society.

NOTA: ^{*}(n = 6); [#](n=18).

Após a confirmação dos requisitos mínimos de validação, o novo método desenvolvido foi considerado adequado para atingir os objetivos propostos neste estudo.

4.3.2 Efeito dos tratamentos térmicos no conteúdo de DNC em carne de frango³

O componente DNC acumulado em tecidos de frangos é o resíduo marcador da nicarbazina, a qual é adicionada na ração de aves. Como esperado, a presença de DNC foi confirmada em concentrações relativamente altas em amostras de peitos de frangos cujas aves foram alimentadas com nicarbazina, sem período de retirada do aditivo da ração. Com base nos resultados do experimento 1, a concentração média do resíduo DNC na carne crua de frangos criados em diferentes grupos foi em média ($n=6$): $1413 \mu\text{g kg}^{-1}$ (grupo A), $1088 \mu\text{g kg}^{-1}$ (grupo B), $808 \mu\text{g kg}^{-1}$ (grupo C), $979 \mu\text{g kg}^{-1}$ (grupo D) e $2137 \mu\text{g kg}^{-1}$ (grupo E). Esta deposição de resíduos é conhecida, visto que estudos (FAO; OMS, 1999; EFSA, 2010a) provaram que o componente DNC é eliminado parcialmente nas excretas de frangos, enquanto que outra parte desta substância pode se depositar na carne e órgãos. As diferentes concentrações de DNC encontradas nos peitos de frango cru, provavelmente, ocorreram devido a variação de metabolismo das aves e influência das condições ambientais, o que é inerente a um experimento com animais.

Todos os tratamentos térmicos considerados neste estudo induziram a degradação do resíduo DNC em carne de frango (FIGURA 17). Foi verificado um efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de processamento térmico e do frango sobre a degradação de DNC (Tabela 17).

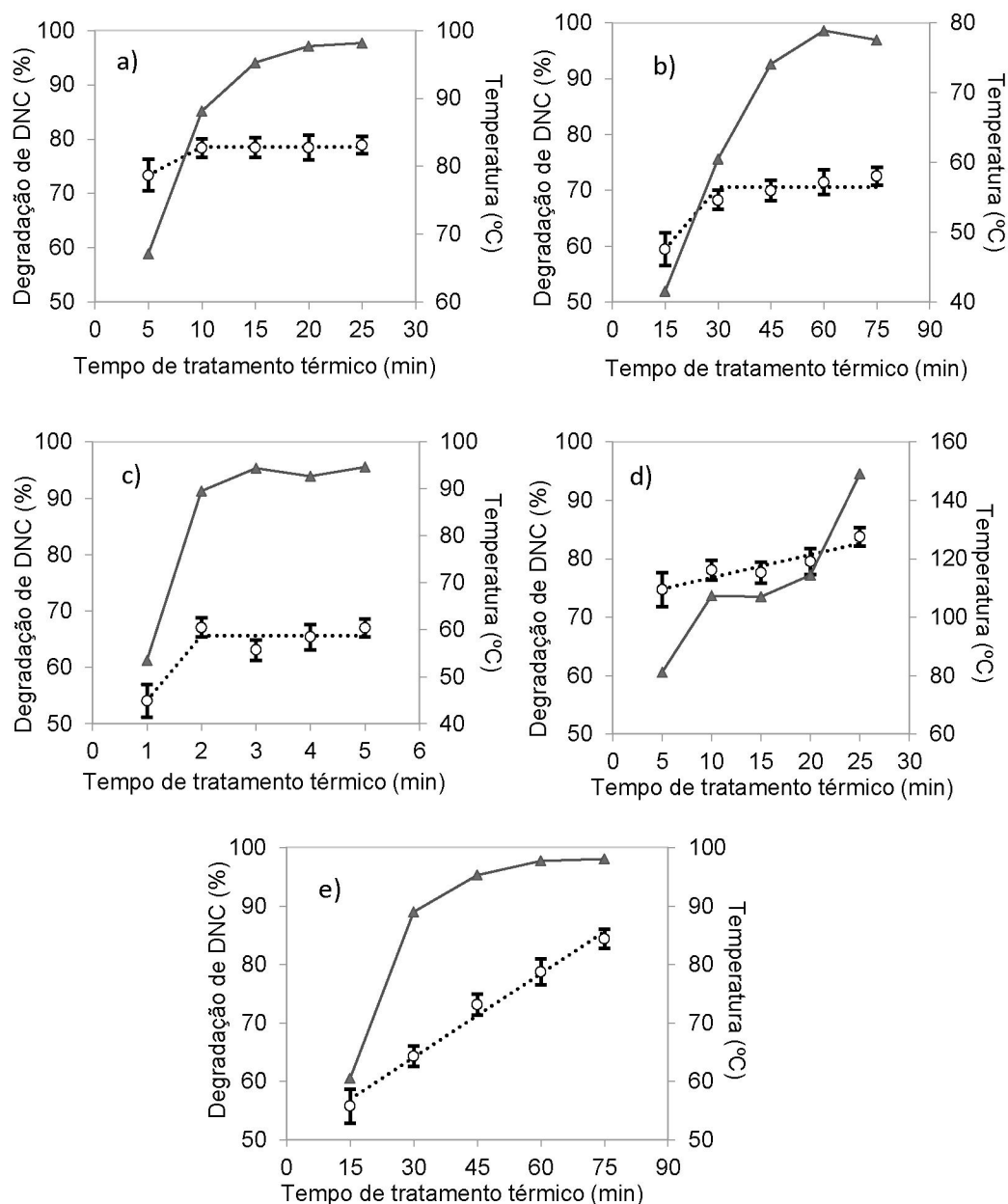
TABELA 17 – NÍVEIS DESCRITIVOS DE PROBABILIDADE DO TESTE *F* DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA A DEGRADAÇÃO DE DNC EM PEITO DE FRANGO AO LONGO DO TEMPO DE TRATAMENTO TÉRMICO

Tratamento térmico	Posição no peito	Frango	Tempo de tratamento térmico
Cozimento em água	0,0223	0,0010	0,0249
Grelha	0,3044	0,0018	0,0009
Micro-ondas	0,0311	<0,0001	0,0015
Fritura	0,0971	<0,0001	<0,0001
Forneamento	0,0211	<0,0001	<0,0001

FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

³ Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

FIGURA 17 – DEGRADAÇÃO DO RESÍDUO DNC EM AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO E MUDANÇAS DA TEMPERATURA AO LONGO DO TEMPO POR TRATAMENTO TÉRMICO



FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

LEGENDA: Cozimento (a); Grelha (b); Micro-ondas (c); Fritura (d); Fomeamento (e). A curva tracejada do gráfico refere-se ao percentual de degradação de DNC. A curva com a linha contínua refere-se ao monitoramento da temperatura de tratamento térmico ao longo do tempo.

Neste primeiro experimento, não foi possível comparar os tratamentos térmicos, pois os frangos foram criados em diferentes lotes, mas a redução do conteúdo de DNC, como resultado do processamento térmico, foi consistentemente evidenciada em todos os métodos (FIGURA 17), fato que não

havia sido completamente elucidado em pesquisas realizadas anteriormente. (ROSE et al., 2000; TARBIN et al., 2005). Com relação aos períodos avaliados, os métodos de cozimento em água, grelha, micro-ondas, e forneamento promoveram um aumento gradual da temperatura da carne, enquanto a fritura induziu um aumento acentuado deste parâmetro.

A análise de contrastes demonstrou que a degradação máxima de 78,5% foi atingida em 10 min para o cozimento em água; de 70,6% em 30 min para grelha; e de 65,6% em 2 min para o micro-ondas. Para estes tratamentos, nenhuma redução significativa nos níveis de DNC foi observada acima destes tempos de processamento térmico. No entanto, quando a fritura e forneamento foram aplicados, a degradação de DNC aumentou linearmente, provavelmente devido a diferenças de temperatura no entorno da porção. Temperaturas elevadas (pelo menos 180 °C) foram alcançadas nos tratamentos térmicos da fritura (óleo) e forneamento (interior do forno), possivelmente favorecendo a degradação de DNC nas camadas mais externas da amostra. Tais temperaturas não foram atingidas pelos outros métodos. Por exemplo, no caso do cozimento em água, a temperatura permaneceu no ponto de ebulição da água (temperatura de 97,8 °C, pressão atmosférica de 71,2 cm Hg).

No geral, os resultados dos experimentos das análises térmicas (seção 4.2) permitiram, de uma forma complementar, obter uma melhor compreensão sobre o fenômeno do desaparecimento de DNC na carne de frango processada termicamente (FIGURA 17). A temperatura máxima na superfície das amostras (50–60 g) foi de ~200 °C (caso do forneamento), enquanto que no seu centro geométrico foi em média de ~88 °C. No entanto, as análises térmicas de TGA-DSC-MS e Py-GC-MS demonstraram que a decomposição de DNC inicia somente a 252 °C, gerando como produto de degradação a *p*-NA. Sendo assim, a decomposição unicamente influenciada pela temperatura é uma hipótese a ser rejeitada na explicação da degradação de DNC observada em carne de frango após o seu processamento térmico. Desta forma, a hidrólise do composto influenciada pela temperatura é a rota de degradação mais provável na carne processada termicamente.

A degradação hidrolítica é uma explicação razoável para a degradação de DNC já que fenilureias análogas a este composto sofrem hidrólise e liberam anilinas derivativas. (AUDU; HEYN, 1988; LAUDIEN; MITZNER, 2001a,b;

SALVESTRINI, et al., 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ, 2003; KWON; XIA, 2012; HUTCHBY, 2013). Além disso, como observado por Tarbin et al. (2005), a concentração de DNC diminuiu em soluções aquosas. Alguns possíveis mecanismos descritos na literatura podem ilustrar a química da degradação da DNC (LAUDIEN; MITZNER, 2001a,b; SALVESTRINI, et al., 2002).

Também deve ser considerado que, além do tempo de tratamento térmico, temperatura e pH, outros fatores intrínsecos à carne de frango (por exemplo presença de enzimas, seção 4.1.2) podem ter exercido alguma influência no processo de degradação, pois a degradação de DNC iniciou em temperaturas inferiores a 70 °C. Com isso, verificou-se que a hidrólise de DNC influenciada pela ação de enzimas é uma das possibilidades para explicar a degradação de DNC observada nos experimentos de processamento térmico da carne.

4.3.3 Eficiência dos tratamentos térmicos na degradação de DNC em carne de frango⁴

Um segundo experimento foi conduzido para comparar a eficiência dos procedimentos de tratamento térmico quando a temperatura de cozimento no centro geométrico das amostras foi atingida. Amostras foram obtidas de frangos de corte alimentados com nicarbazina no grupo F, os quais acumularam $461 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=12$) de DNC no tecido muscular do peito. Níveis similares de DNC em peito de frango também foram reportados em estudos prévios, onde a nicarbazina foi administrada sem período de retirada. (OLEJNIK et al., 2011).

Durante o tratamento térmico, foi observado que a degradação de DNC na carne foi afetada ($p < 0,05$) pelo método de cozimento e pelo frango. A posição da amostra no peito não apresentou efeito significativo. Os níveis descritivos de probabilidade do teste F da análise da variância para a degradação de DNC são apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 – NÍVEIS DESCRITIVOS DE PROBABILIDADE DO TESTE F DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA A DEGRADAÇÃO DE DNC EM PEITO DE FRANGO SUBMETIDO A TRATAMENTO TÉRMICO

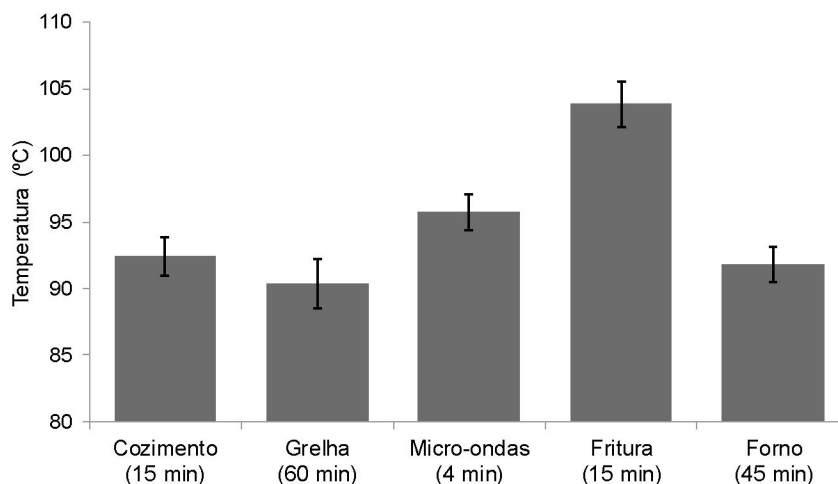
Posição no peito	Frango	Tratamento Térmico
0,4229	0,0067	0,0292

FONTE: O autor (2018).

Todos os tratamentos térmicos avaliados apresentaram temperaturas no centro geométrico das porções de peito de frango que superaram a temperatura de cozimento de 70°C no centro geométrico (Figura 18). Como demonstrado na Figura 19, na avaliação comparativa da eficiência dos tratamentos térmicos, dentre os processos avaliados, o cozimento em água foi o método mais eficiente na degradação de DNC em carne de frango, promovendo redução de 69 % do resíduo. Este método foi significativamente ($p < 0,05$) melhor que o forneamento, o qual foi o menos eficiente para o tempo selecionado. Grelha, micro-ondas e fritura demonstraram desempenho semelhante ao cozimento. A migração de DNC para a água de cozimento e para o óleo de fritura foram negligenciados neste estudo, tendo como base as evidências reportadas previamente. Nestas matrizes não foram encontrados traços de DNC após a realização dos tratamentos térmicos. (ROSE et al., 2000; TARBIN et al., 2005).

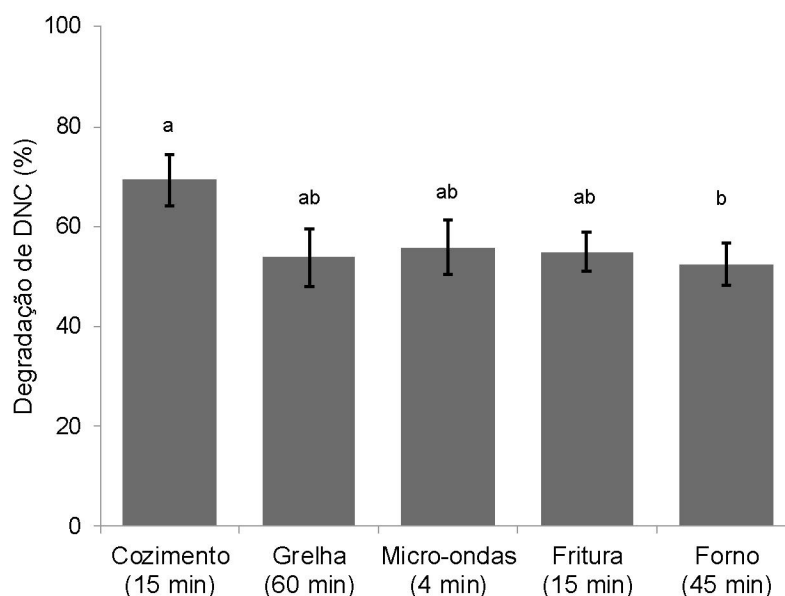
⁴ Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

FIGURA 18 – TEMPERATURA MÉDIA NO CENTRO GEOMÉTRICO DAS AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO



FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

FIGURA 19 – EFICIÊNCIA DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS NA DEGRADAÇÃO DO RESÍDUO DNC EM CARNE DE FRANGO



FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A perda de massa também foi monitorada após a aplicação dos processamentos térmicos neste segundo experimento (Tabela 19). As mudanças nas massas foram relacionadas à perda de água, conforme reportado anteriormente (THIPPAREDDI; SANCHEZ, 2006). Dentre os tratamentos

térmicos, o cozimento em água demonstrou a menor ($p < 0,05$) perda de água, a qual foi aceita como a principal razão para a eficiência superior deste método na degradação de DNC. A manutenção da umidade da carne no método de cozimento em água, favoreceu a degradação hidrolítica de DNC, em contraste com os demais tratamentos térmicos. Desta forma, a perda de água exerceu influência na degradação de DNC em carne de frango processada termicamente.

TABELA 19 – PERDA DE MASSA DAS AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO APÓS PROCESSAMENTO TÉRMICO

Tratamento Térmico	Massa da porção crua (g)	Massa da porção cozida (g)	Perda de massa (%)
Cozimento em água	59,6	43,5	27,2 ^a
Grelha	57,9	33,6	41,9 ^c
Micro-ondas	56,0	36,4	36,0 ^b
Fritura	59,3	36,4	39,0 ^{b,c}
Forneamento	63,7	38,3	39,9 ^{b,c}

FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Degradation of 4,4-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018). Copyright (2018) American Chemical Society.

LEGENDA: Letras diferentes entre os tratamentos térmicos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Uma análise holística entre este estudo e as pesquisas conduzidas por Rose et al. (2000) e Tarbin et al. (2005), quanto aos métodos de determinação de DNC e os percentuais de degradação obtidos, está apresentada na Tabela 20. Com relação ao método de determinação, os três estudos utilizaram cromatografia líquida, com diferença no detector, sendo o espectrômetro de massas, empregado nesta pesquisa, o mais sensível, confiável disponível atualmente e recomendado por órgãos legisladores nacionais e internacionais. Tanto Tarbin et al. (2005) quanto Rose et al. (2000) não observaram degradação de DNC pelo cozimento em água, sendo que Tarbin e colaboradores mencionaram aumento da concentração de DNC (10%), diferentemente deste estudo que constatou uma maior degradação por este processo. Todos os autores observaram que a grelha, micro-ondas e fritura promoveram a diminuição do resíduo no peito de frango, embora alguns tempos de tratamento térmico fossem diferentes.

TABELA 20 – ESTUDOS QUE AVALIARAM A DEGRADAÇÃO DE DNC EM PEITO DE FRANGO SUBMETIDO A TRATAMENTO TÉRMICO

	Rose et al. (2000)		Tarbin et al. (2005)		O autor (2018)	
Método de determinação de DNC	HPLC-UV		HPLC-UV		LC-MS/MS	
LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Não informado		5,0		18,6	
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Não informado		Não informado		6,1	
Concentração inicial média de DNC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Não informado		1139		461	
Tratamento Térmico	Degradação DNC (%)	Tempo (min)	Degradação DNC (%)	Tempo (min)	Degradação DNC (%)	Tempo (min)
Cozimento em água	Não degradou	10 a 60	Não degradou	10	69	15
Grelha	22 a 31	Não mencionou	29	15	54	60
Micro-ondas	22 a 31	1,5 a 5	6	2	56	4
Fritura	22 a 31	10 a 15	22	15	55	15
Forneamento	Não realizado	-	Não realizado	-	52	45

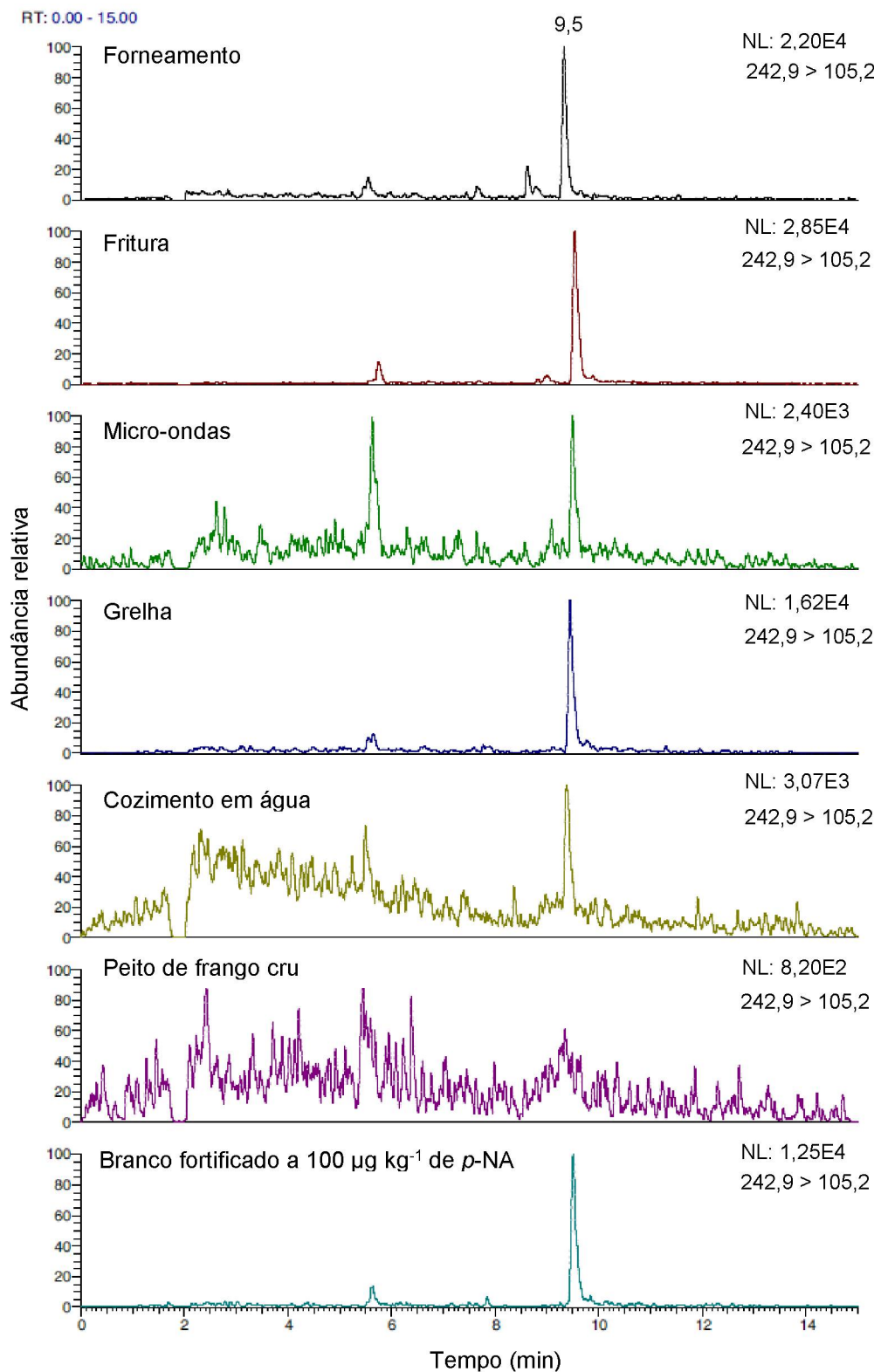
FONTE: O autor (2018).

4.3.4 Liberação de *p*-NA em peito de frango contendo DNC

A *p*-NA é esperada como produto de degradação do resíduo DNC em carne de frango processada termicamente conforme resultados dos ensaios da hidrólise e das análises térmicas. As análises de LC-MS/MS mostraram que as amostras de peito de frango cru contendo DNC estavam isentas de *p*-NA. Nas amostras de carne submetidas aos tratamentos térmicos, as análises indicaram a ocorrência de *p*-NA no tempo de retenção de 9,5 min (Figura 20).

Estes resultados corroboram a hipótese inicialmente estabelecida no experimento da hidrólise em soluções aquosas, mostrando que ocorre a liberação de *p*-NA a partir da degradação hidrolítica da DNC. Este fato da ocorrência de *p*-NA em carne de frango a partir da degradação da DNC pela aplicação de tratamentos térmicos não havia sido reportado ainda.

FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS DA ANÁLISE DE *p*-NA EM AMOTRAS DE PEITO DE FRANGO CONTENDO DNC



Fonte: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Detection of *p*-nitroaniline released from degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast during thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 32, p. 9002–9008, 2019).
Copyright (2019) American Chemical Society.

Nas amostras de peito de frango contendo DNC do experimento 1, no geral, a liberação de *p*-NA foi mais pronunciada ao longo do tempo de tratamento térmico (Tabela 21). Apesar de algumas amostras apresentarem concentrações entre o LOD e LOQ do método analítico, esta limitação quantitativa não impactou na avaliação dos resultados.

TABELA 21 – LIBERAÇÃO DE *p*-NA DA CARNE DE FRANGO CONTENDO DNC AO LONGO DO TEMPO DE TRATAMENTO TÉRMICO

Tratamento térmico	Tempo (min)	<i>p</i> -NA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cozimento	0	<LOD
	5	<LOQ
	10	<LOQ
	15	<LOQ
	20	$38,4 \pm 3,7$
	25	$51,9 \pm 4,9$
Grelha	0	<LOD
	15	<LOQ
	30	$60,6 \pm 9,0$
	45	$141,2 \pm 31,5$
	60	$210,4 \pm 43,1$
	75	$326,3 \pm 47,6$
Micro-ondas	0	<LOD
	1	<LOD
	2	<LOQ
	3	<LOQ
	4	<LOQ
	5	<LOQ
Fritura	0	<LOD
	5	$36,9 \pm 8,4$
	10	$82,5 \pm 13,6$
	15	$78,0 \pm 6,5$
	20	$200,6 \pm 52,7$
	25	$640,0 \pm 143,3$
Forneamento	0	<LOD
	15	<LOD
	30	<LOQ
	45	$79,8 \pm 18,5$
	60	$191,7 \pm 48,0$
	75	$456,9 \pm 50,7$

FONTE: Reimpresso (adaptado) com permissão de (BACILA, D.M. et al. Detection of *p*-nitroaniline released from degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast during thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 32, p. 9002–9008, 2019). Copyright (2019) American Chemical Society.

NOTA: Réplicas para cada tratamento térmico: $n=6$. LOD: $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. LOQ: $30 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Em princípio, o aumento da *p*-NA poderia ser atribuído à pré-concentração em função da desidratação/perda de água da amostra ao longo do tratamento térmico. Para eliminar este efeito e revelar o aparecimento de *p*-NA com mais clareza, os dados de concentração foram corrigidos pela perda de água. No entanto, ao regredir o resultado para a base *in natura* (antes do

tratamento térmico), observou-se que o comportamento de aumento da *p*-NA foi o mesmo, embora com valores absolutos diferentes. O acúmulo de *p*-NA foi resultado direto da sua liberação pela hidrólise da DNC e não simplesmente pela concentração do analito devido à perda de água.

Nas amostras de peito de frango do experimento 2, também foi confirmada a ocorrência de *p*-NA na carne contendo DNC e submetida a diferentes tratamentos térmicos (Tabela 22). Comparando os níveis iniciais de DNC da carne crua dos experimentos 1 e 2, foi verificado que os frangos acumularam quantidades menores no experimento 2 (seção 4.4.2). Embora este experimento tenha sido delineado com objetivo principal de comparar os diferentes métodos no que diz respeito a degradação de DNC, foi possível verificar que mesmo com níveis iniciais menores de DNC, ocorreu a liberação de *p*-NA na carne de frango processada termicamente.

TABELA 22 – NÍVEIS DE *p*-NA EM CARNE DE FRANGO CONTENDO DNC EM DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS EM UM TEMPO FIXO

Tratamento térmico	Tempo (min)	<i>p</i> -NA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cozimento	15	<LOQ
Grelha	60	$146,6 \pm 16,6$
Micro-ondas	4	<LOQ
Fritura	15	$66,9 \pm 6,9$
Forneamento	45	$77,4 \pm 14,6$

FONTE: O autor (2019).

NOTA: Réplicas para cada tratamento térmico: $n=12$. LOD: $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$. LOQ: $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Avaliando os resultados de ambos os experimentos, a degradação de DNC com aparecimento concomitante de *p*-NA em amostras reais foi definitivamente provado aqui. Contudo, considerando que mais de 50% do resíduo de DNC inicial foi degradado nos tempos iniciais dos tratamentos térmicos (5 min para cozimento em água, 15 min para grelha, 1 min para micro-ondas, 5 min para fritura, e 15 min para forneamento), em resposta a esta decomposição, era esperado um aumento acentuado do conteúdo da *p*-NA dentro do mesmo período. Desta forma, este processo de degradação da DNC não parece ser tão previsível assim. Isto se baseia no fato que tal processo deve seguir um esquema muito mais complexo, devido a inúmeros fatores que se combinam em uma matriz complexa como a carne. Com isso, outras transformações da *p*-NA (reações paralelas) podem estar ocorrendo durante a aplicação dos tratamentos térmicos, visto que estudos mostraram que a *p*-NA foi

convertida a outros derivados em sistemas biológicos. (MATÉ; RYAN; WRIGHT, 1967; ANDERSON et al., 1984; CHOPADE; MATTHEWS, 1984).

Outras razões que se somam para justificar os níveis de *p*-NA são as particularidades intrínsecas de cada tratamento térmico. O que chama atenção e que parece não estar muito claro são os valores obtidos ao se aplicar o cozimento em água e no micro-ondas, os quais foram os menores níveis encontrados. Desta forma, as amostras da água de cozimento coletadas a partir da cocção do peito de frango foram também analisadas, onde se detectou níveis de *p*-NA entre 4–10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Logo, particularmente neste tratamento térmico, somam-se as perdas por lixiviação da *p*-NA para a água do cozimento do peito de frango. No micro-ondas, a *p*-NA também pode estar sendo lixiviada no suco que foi exsudado da carne durante a aplicação deste tratamento térmico.

Os resultados deste estudo indicaram que a degradação de DNC em carne de frango resultou na liberação de *p*-NA após a aplicação dos tratamentos térmicos. Considerando que a legislação atual permite que a carne crua pode apresentar até 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de DNC, verifica-se que existe uma possibilidade da ocorrência de *p*-NA em carne processada termicamente. Isto, portanto conduz a uma perspectiva para abordagens mais aprofundadas para se verificar o impacto na segurança do alimento.

4.4 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram obter as observações descritas resumidamente a seguir.

A degradação da DNC com liberação de *p*-NA foi evidenciada por meio do experimento da hidrólise em soluções aquosas. Adicionalmente, foram obtidas a cinética da degradação da DNC a 100 °C e a constante da velocidade de degradação (k' : 0,0651 h^{-1} em pH 2; 0,0592 h^{-1} em pH 4; 0,0561 h^{-1} em pH 6; 0,0492 h^{-1} em pH 8 e 0,0296 h^{-1} em pH 10) derivada do modelo de pseudo-primeira ordem em toda faixa de pH avaliado.

Ao submeter as amostras de peito de frango contendo DNC a métodos convencionais de preparo da carne, foi verificada a redução deste resíduo em todos os tratamentos térmicos, fato que não havia sido completamente elucidado. A degradação máxima de 78,5% foi atingida em 10 min para o

cozimento em água, 70,6% em 30 min para grelha e 65,6% em 2 min para o micro-ondas. Para estes tratamentos, nenhuma redução significativa foi observada nos níveis de DNC em tempos maiores de processamento térmico. No entanto, quando a fritura e forneamento foram aplicados, a degradação de DNC ocorreu de forma linear.

No experimento do comparativo dos tratamentos térmicos também foi verificado que os níveis de DNC reduziram, resultando na sua degradação na faixa de 52–69%. Os resultados mostraram que o cozimento em água foi o método mais eficiente na degradação de DNC. Fatores como tempo de tratamento térmico, perda de água e temperatura das amostras exerceram influência na degradação do resíduo DNC em carne de frango processada termicamente.

O perfil de decomposição térmica da DNC foi obtido de maneira eficaz por meio das técnicas de TGA–DSC-MS e Py–GC-MS registrando os principais eventos térmicos referentes à degradação e produtos da decomposição térmica. O uso das análises térmicas em um estudo que trata da avaliação da degradação de um resíduo em carne pode ser considerado algo inovador. Na análise de TGA–DSC-MS foi registrado um evento endotérmico entre 252–280 °C, o qual foi atribuído à decomposição térmica da DNC. A *p*-NA foi identificada como um dos produtos de degradação da DNC tanto por TGA–DSC-MS quanto por Py–GC-MS. Ao se avaliar em conjunto as informações dos experimentos das análises térmicas e da hidrólise, foi concluído que a via mais provável de degradação de DNC na carne de frango submetida a métodos convencionais de preparo é de uma hidrólise influenciada pela temperatura.

Poucos estudos identificaram com sucesso os produtos de degradação de resíduos de anticoccidianos em alimentos submetidos a tratamento térmico. Um dos fatores que dificulta a identificação de produtos de degradação consiste na disponibilidade de métodos analíticos para a quantificação destes produtos em uma matriz complexa como a carne. Logo, para a determinação da *p*-NA em peito de frango, um novo método analítico foi desenvolvido e validado neste trabalho, atendendo os requisitos mínimos para a sua aplicação.

Ao se realizar o monitoramento do produto de degradação da DNC nas amostras de peito de frango submetidas a métodos convencionais de preparo da

carne, a liberação de *p*-NA foi comprovada. Verificou-se que os níveis de *p*-NA foram mais pronunciados ao longo do tempo de tratamento térmico e que cozimento em água e micro-ondas apresentaram os menores níveis, apesar de ser verificado que ocorreu lixiviação de uma pequena quantidade de *p*-NA para água de cozimento.

Este fato da ocorrência de *p*-NA em carne de frango contendo DNC e processada termicamente foi confirmada pela primeira vez neste estudo. Os resultados corroboram a hipótese inicialmente estabelecida no experimento da hidrólise em soluções aquosas, mostrando que ocorre a liberação de *p*-NA a partir da degradação hidrolítica da DNC.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, avaliou-se o efeito do processamento térmico sobre o conteúdo do resíduo da nicarbazina (DNC) acumulado em carne de frango e a liberação da *p*-nitroanilina como produto de degradação do composto DNC. Os resultados mostram que é possível reduzir a concentração do resíduo DNC contido em peito de frango pela aplicação de tratamentos térmicos convencionais como cozimento em água, grelha, micro-ondas, fritura e forneamento. A degradação do resíduo ocorre na faixa de 52 a 69%, sendo atribuída à hidrólise do composto. Os resultados mostram que o cozimento em água é o método mais eficiente na degradação de DNC. Fatores como tempo de tratamento térmico, perda de água e temperatura das amostras exercem influência na degradação do resíduo DNC. A *p*-NA é identificada como produto de degradação do resíduo DNC em peito de frango processado termicamente. A ocorrência da *p*-NA a partir da degradação hidrolítica de DNC não havia sido evidenciada até a presente data. A liberação da amina foi crescente ao longo do tempo de tratamento térmico. Cozimento em água e micro-ondas apresentaram os menores níveis de *p*-NA, enquanto grelha, fritura e forneamento atingiram 326,3, 640,0 e 456,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Desta forma, é importante que se considere o efeito do processamento térmico na concentração de DNC e *p*-NA em peito de frango. Finalmente, recomenda-se um melhor entendimento sobre os produtos de degradação, uma vez que a partir do composto principal podem ser formados outros compostos de maior toxicidade. Os resultados deste trabalho podem fornecer subsídios para futuras revisões no limite máximo de resíduo da nicarbazina em carne de frango.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

A sistemática da avaliação realizada neste estudo pode ser aplicada em resíduos de outros anticoccidianos a fim de verificar o efeito do processamento térmico da carne de frango no conteúdo destes resíduos, bem como conduzir a identificação e quantificação dos seus produtos de degradação.

Sugere-se a realização de um estudo sobre o efeito da concentração inicial de DNC para estabelecer uma relação da concentração inicial com o percentual de degradação de DNC e com o acúmulo da *p*-NA.

Verificou-se que as informações sobre a toxicidade da *p*-NA são limitadas e uma investigação futura é requerida para determinar o real impacto na segurança da carne processada termicamente e na saúde do consumidor. Neste contexto, é recomendada a realização de estudos toxicológicos da *p*-NA nas concentrações determinadas neste trabalho.

Investigação sobre as possíveis transformações da *p*-NA na carne de frango, submetida a métodos convencionais de preparo, pode ser conduzida a fim de verificar se ocorre a formação de derivados deste composto.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. BACILA, D. M.; FEDDERN, V.; MAFRA, L. I.; SCHEUERMANN, G. N.; MOLOGNONI, L.; DAGUER, H. Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. **Food Research International**, n. 99, p. 31–40, 2017. Artigo publicado.
2. BACILA, D. M.; CUNHA JUNIOR, A; WEBER, I. F.; SCHEUERMANN, G. N.; COLDEBELLA, A.; CARON, L.; MOLOGNONI, L.; DAGUER, H.; MAFRA, L. I.; FEDDERN, V. Degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 66, p.8391-8397, 2018. Artigo publicado.
3. BACILA, D. M.; LAZZAROTO, M.; CUNHA JUNIOR, A; SCHEUERMANN, G. N.; FEDDERN, V.; MAFRA, L. I. Thermal profile of 4,4'-dinitrocarbanilide determined by simultaneous thermogravimetry-differential scanning calorimetry-mass spectrometry (TG-DSC-MS) and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Py-GC-MS). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, xx, xx–xx, 2019. Artigo publicado *on-line*.
4. BACILA, D. M.; FEDDERN, V.; SCHEUERMANN, G. N.; GRESSLER, V.; MAFRA, L. I.; CUNHA JUNIOR, A. Detection of *p*-nitroaniline released from degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast during thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, p.9002-9008, 2019. Artigo publicado.
5. BACILA, D. M.; CUNHA JUNIOR, A; WEBER, I. F.; SCHEUERMANN, G. N.; MAFRA, L. I.; FEDDERN, V. Efeito da aplicação de diferentes tratamentos térmicos no conteúdo de resíduo de anticoccidiano em carne de frango. **XXXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA) 2018**. Belém, Pará. Apresentação de e-pôster realizada.

6. FEDDERN, V.; BACILA, D. M.; CUNHA JUNIOR, A; WEBER, I. F.; SCHEUERMANN, G. N.; MAFRA, L. I. Depleção do anticoccidiano nicarbazina em peito de frango. **XXXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA) 2018**. Belém, Pará. Apresentação de e-pôster realizada.
7. WEBER, I. F.; BACILA, D. M.; CUNHA JUNIOR, A; MAFRA, L. I; FEDDERN, V. Estudo cinético da hidrólise de resíduo de nicarbazina. **12ª Jornada de Iniciação Científica (JINC) 2018**. Concórdia, Santa Catarina. Apresentação de pôster realizada.

REFERÊNCIAS

- ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). **Relatório Anual ABPA 2018**. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2018>>. Acesso em: 29 jan. 2019.
- ACD; LABS. ACD/ChemSketch (Freeware), versão C50E41, 2018. Disponível em:< <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/download.php>>. Acesso em: 14 jan. 2019.
- ANDERSON, M. M. et al. Metabolism of 4-nitroaniline by rat liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 12, n. 2, p. 179–185, 1984.
- AUDU, A. A.; HEYN, A. H. A. Comparative hydrolysis of substituted ureas in a mixed alcoholic-water solution. **Water Research**, v. 22, n. 9, p. 1155-1162, 1988.
- ATTIA, A. K.; SAAD, A. S.; ALARAKI, M. S.; ELZANFALY, E. S. Study of thermal analysis behavior of fenbendazole and rafoxanide. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.7, p.329–334, 2017.
- BACILA, D. M. et al. Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. **Food Research International**, n. 99, p. 31–40, 2017.
- BACILA, D. M. et al. Degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast by thermal processing. **Journal of Food Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 8391–8397, 2018.
- BACILA, D. M. et al. Thermal profile of 4,4'- dinitrocarbanilide determined by simultaneous thermogravimetry-differential scanning calorimetry-mass spectrometry (TG-DSC-MS) and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Py-GC-MS). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p.1-5, 2019.
- BACILA, D. M. et al. Detection of *p*-nitroaniline released from degradation of 4,4'-dinitrocarbanilide in chicken breast during thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p.9002-9008, 2019.
- BENNET, W. B.; SAUNDERS, J. H.; HARDY, E. E. The preparation of isocyanates by the thermal decomposition of substituted ureas. **Journal of American Chemical Society**, v. 75, n. 9, p. 2101–2103, 1953.
- BENIGNI, R.; PASSERINI, L. Carcinogenicity of the aromatic amines: from structure – activity relationships to mechanisms of action and risk assessment. **Reviews in Mutation Research**, v. 511, p. 191–206, 2002.
- BERCHIERI JÚNIOR, A. et al (Ed.). **Doenças de Aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas - FACTA, 2009.

BLAKE, P. G.; IJADI-MAGHSOODI, S. The kinetics and mechanism of the thermal decomposition of alkyl isocyanates. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 15, p. 609–618, 1983.

BLAKE, D. P.; TOMLEY, F. M. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. **Trends in Parasitology**, v. 30, p. 12-19, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004a. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 set. 2004. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal. Instrução Normativa nº 13 de 30/11/2004b. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 1 dez. 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/IN132004alteradapelaIN44201511.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 26 de 09/07/2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. PNCR 2010. Instrução Normativa SDA nº 6 de 25/02/2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 41, 28 fev. 2011. Seção 1, p. 4 -5. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. PNCR 2011. Instrução Normativa SDA nº 7 de 04/04/2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 67, 5 abr. 2012. Seção 1, p.12. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. PNCR 2012. Instrução Normativa SDA nº 7 de 27/03/2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. PNCR 2013. Portaria SDA nº 60 de 07/05/2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos>>.

animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. PNCRC 2014. Portaria SDA nº22, de 07/04/2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 68 10 abr. 2015. Seção 1, p. 7-10. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa SDA Nº 13, de 15 de julho de 2015: Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2015. **Diário Oficial da União**, n. 136, Brasília, DF, 20 jul. 2015a. Seção 1, p. 5-12. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2015.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa Nº 44 DE 15/12/2015. Altera a Instrução Normativa nº 13 de 2004 e Instruções Normativas MAPA nºs 15 e 30 de 2009 e 29 de 2010. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 17 dez. de 2015b. Disponível em: <<https://www legisweb.com.br/legislacao/?id=313804>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Resultados Gerais do Subprograma de Monitoramento e Subprograma Exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC 2015c**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Projeções do Agronegócio**. Brasil 2014/15 a 2024/25. Projeções de Longo Prazo. Brasília, julho de 2015d. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-brasil-2014-2015-a-2024-2025.pdf/view>>. 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Resultados Gerais do Subprograma de Monitoramento e Subprograma Exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC 2016**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC/Animal. Resultados PNCRC 2017**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa Nº 54 DE 17/12/2018. **Diário Oficial**, Brasília, DF, ISSN 1677-7042, seção 1, nº 2, 3 jan. de 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/57733217>. Acesso em: 07 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Listas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/registro-cadastro>>. Acesso em: 07 mar. 2019.

BRATTON, A. C.; MARSHALL, E. K. A new coupling component for sulfanilamide determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 128, p. 537-550, 1939.

BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals drugs and biologicals**. 12th.ed. Rahway: Merck & Co., 1996.

CANNAVAN, A.; KENNEDY, D. G. Possible causes of nicarbazin residues in chicken tissues. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 12, p. 1001–1006, 2000.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; et al. Determination of herbicides, including thermally labile phenylureas, by solid-phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 1–12, 2003.

CERVANTES, H. M. Antibiotic-free poultry production : Is it sustainable ? **Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, p. 91–97, 2015.

CHAPMAN, H. D. Milestones in avian coccidiosis research : A review. **Poultry Science**, v. 93, p. 501–511, 2014.

CHEN, J. P.; ISA, K. Thermal decomposition of urea and urea derivatives by simultaneous TG/DTA/MS. **Journal of Mass Spectrometry Society of Japan**, v. 46, n. 4, p. 299–303, 1998.

CHOPADE, H.M.; MATTHEWS, H.B.. Disposition and metabolism of p-nitroaniline in the male F-344 rat. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.4, p. 485–493, 1984.

CLARKE, L. et al. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 358–374, 2014.

COLEMAN, M. R. et al. Determination and confirmation of nicarbazin, measured as 4,4-dinitrocarbanilide (DNC), in chicken tissues by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: First action 2013.07. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 2, p. 630–640, 2014.

CRUZ, C.; RIBEIRO, U. **Metodologia científica: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Axcell Books do Brasil Editora, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

DANAHER, M. et al. Survey of the anticoccidial feed additive nicarbazin (as dinitrocarbanilide residues) in poultry and eggs. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 1, p. 32-40, 2008.

DAWSON, P. L.; MANGALASSARY, S.; SHELDON, B. W. Thermal Processing of Poultry Products. In: SUN, D. (Ed). **Thermal Food Processing: new Technologies and Quality issues**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p.197-204.

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft). **4-nitroaniline. The MAK Collection for Occupational Health and Safety, Part I, MAK Value Documentations**. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.mb10001e2814/abstract> <>. Acesso em: 14 mar. 2019.

DORNE, J. L. C. M. et al. Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 270, n. 3, p. 196–208, 2013.

EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request from the Commission on the efficacy and safety of the coccidiostat Koffogran. (Question N°EFSA-Q-2003-041). **The EFSA Journal**, n.16, p. 1-40, 2003. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/16>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

EFSA (European Food Safety Authority). EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific opinion on the safety and efficacy of koffogran (nicarbazin) as a feed additive for chickens for fattening. **EFSA Journal**, v.8, n.3, p. 1-40, 2010a. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1551>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

EFSA (European Food Safety Authority). EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific opinion on the safety and efficacy of Maxiban G160 (narasin and nicarbazin) for chickens for fattening. **EFSA Journal**, v.8, n. 4, p. 1-45, 2010b. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1574>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

EPA (Environmental Protection Agency). **Pesticide Fact Sheet**. Name of chemical: nicarbazin, reason for issuance: conditional registration, data issued: november 2005. United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7501C). Disponível em:

<nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=P100C233.TXT>. Acesso em: 14 mar. 2019.

EPA (Environmental Protection Agency). **Provisional peer reviewed toxicity values for p-nitroaniline (CASRN 100-01-6)**. Superfund Health Risk Technical Support Center National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, OH 45268. EPA/690/R-09/038F, Final 2-09-2009. Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ncea/pprtv/documents/Nitroaniline4.pdf>>. Acesso em: 01 mai. 2019.

ESTADOS UNIDOS. **Regulatory Information**. Code of Federal Regulations (annual edition). SuDoc Class Number AE 2.106/3:21/. Title 21 - Food and Drugs. Chapter I – Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Subchapter E – Animal drugs, Feeds, and related products. Part 556 – Tolerances for residues of new animal drugs in foods. Subpart B - Specific Tolerances for Residues of New Animal Drugs. Section 556.445 - Nicarbazin. April 1, 2012. Disponível em: <<https://www.gpo.gov/fdsys/search/pagedetails.action?collectionCode=CFR&searchPath=Title+21%2FChapter+I%2FSubchapter+E&granuleId=CFR-2012-title21-vol6-sec556-445&packageId=CFR-2012-title21-vol6&oldPath=Title+21%2FChapter+I%2FSubchapter+E%2FPart+556%2FSubpart+B%2FSection+556.445&fromPageDetails=true&collapse=false&ycord=1368>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

FAO; OMS (Food and Agricultural Organization; Organização Mundial da Saúde). **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**: fiftieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Who technical report series 888, 1999.

FAO; OMS (Food and Agricultural Organization; Organização Mundial da Saúde). **Codex Alimentarius. International Food Standards. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods**. CX/MRL 2-2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BMRL%2B2%252FMRL2e.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

FEDDERN, V.; DE LIMA, G. J. M. M. Demandas no estudo e levantamento de resíduos químicos na carne de suínos e aves. **Avicultura Industrial**, p. 14–23, 2015.

FLETCHER, D. L. Broiler breast meat color variation, pH, and texture. **Poultry Science**, v.78, n.9, p.1323–1327, 1999.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

HUTCHBY, M. Urea Hydrolysis. In: **Novel Synthetic Chemistry of Ureas and Amides**. Springer Thesis (Recognizing Outstanding Ph.D. Research). Springer, Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. p. 57 -70.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. Current Step 4 version. Parent Guideline dated 27 October 1994. Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005.

KANTIANI, L. et al. Emerging food contaminants: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2413–2427, 2010.

KWON, J-W; XIA, K. Fate of triclosan and triclocarban in soil columns with and without biosolid surface application. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 262–269, 2012.

LAUDIEN, R.; MITZNER, R. Phenylureas. Part 1. Mechanism of the basic hydrolysis of phenylureas. **Journal of the Chemical Society**, v. 11, p. 2226-2229, 2001a.

LAUDIEN, R.; MITZNER, R. Phenylureas. Part 2. Mechanism of the acid hydrolysis of phenylureas. **Journal of the Chemical Society**, v. 11, p. 2230-2232, 2001b.

LAWRIE, R. A.; LEDWARD, D. A. **Lawrie's meat science**. 7. ed. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited. 2006.

LEE, M. J.; ANSTEE, J. H. Assays of proteases by diazotization of *p*-nitroaniline in microplates. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 480–482, 1994.

MATÉ, C.; RYAN, A.J.; WRIGHT, S.E. Metabolism of some 4-nitroaniline derivatives in the rat. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 5, p. 657–663, 1967.

MAURICIO, A. Q.; LINS, E. S.; ALVARENGA, M. B. A National Residue Control Plan from the analytical perspective - The Brazilian case. **Analytica Chimica Acta**, v. 367, p. 333-336, 2009.

MOATS, W. A. The effect of processing on veterinary residues in foods. In: Lauren S. Jackson; Mark G. Knize; Jeffrey N. Morgan (Ed.). **Impact of processing on food safety**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 233-241, 1999.

MORELLI, J. J. Thermal analysis using mass spectrometry: A review. **Journal of Analytical Applied Pyrolysis**, v. 18, p.1–18,1990.

NAIR, R. S.; AULETTA, C. S.; SCHROEDER, R. E.; JOHANNSEN, F. R. Chronic toxicity, oncogenic potential, and reproductive toxicity of p-nitroaniline in rats. **Toxicological Sciences**, v. 15, n.3, p. 607–621, 1990.

NGUYEN, V. et al. The degradation of oxytetracycline during thermal treatments of chicken and pig meat and the toxic effects of degradation products of oxytetracycline on rats. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n.5, 2842–2850, 2015.

NIST (National Institute of Standards and Technology); EPA (Environmental Protection Agency); NTH Mass Spectral Library (NIST 05). Spectra Database. Japan: Shimadzu Corporation; 2005. p. CD-ROM.

NTP (National Toxicology Program). **NTP toxicology and carcinogenesis studies of p-nitroaniline (CAS No. 100-01-6) in B6C3F1 mice (Gavage Studies)**. National Toxicology Program Technical Report Series, 418, 1–203, 1993.

OLEJNIK, M.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; JEDZINIAK, P. DEPLETION Study on Nicarbazin and Narasin in Tissues and Eggs on Hens Housed in Deep Litter. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 55, p. 761–766, 2011.

PENZ, A. M.; VIEIRA, S. L.; LUDKE, J. V. Nicarbazin residues in broiler tissue and litter. **Applied Poultry Science**, v.8, p. 292-297, 1999.

PIMENTEL- GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 15.^a ed. Piracicaba: FEALQ, 2000. 477 p.

PIZARRO, L. del C. R.; FERREIRA, A. J. P. Anticoccidianos. In: SPINOSA, H. S. de; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S. L. **Medicamentos em animais de produção**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 312- 329.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. Anticoccidianos. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. **Farmacologia aplicada à Avicultura. Boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Roca, 2005, p. 189– 200.

ROGERS, E. F. et al. Nicarbazin Complex Yields Dinitrocarbanilide as Ultrafine Crystals with Improved Anticoccidial Activity. **Science**, v. 222, n. 10, p. 630–632, 1983.

ROSE, M.; BYGRAVE, J.; SHARMAN, M. Investigation into the thermal stability of nicarbazin and nitroimidazoles: an overview. **Proceedings** of the Euroresidue IV conference, p. 935-943, 2000.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3 ed. Viçosa: UFV, 252 p., 2011.

SAS INSTITUTE INC. System for Microsoft Windows, Release 9.4, Cary, NC, USA, 2002-2012. (cd-rom).

SALVESTRINI, S.; CERBOA, P. di; CAPASSO, S. Kinetics and mechanism of hydrolysis of phenylureas. **Journal of the Chemical Society**, v. 1, p.1889–1893, 2002.

SCHABER, P. M.; COLSON, J.; HIGGINS, S.; et al. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochimica Acta**, v. 424, p. 131–142, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLEW, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOBEIH, K. L.; BARON, M.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, J. Recent trends and developments in pyrolysis-gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1186, p.51-66, 2008.

SPINOSA, H. S. de; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S. L. **Medicamentos em animais de produção**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

STRADELLA, L.; ARGENTERO, M. A DSC, TG, IR study of the thermal decomposition of some alkyl-and aryl-ureas. **Thermochimica Acta**, v. 268, p. 1–7, 1995.

TARBIN et al. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: nicarbazin (dinitrocarbanilide component). **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.11, p.1126–1131, 2005.

THIPPAREDDI, H.; SANCHEZ, M. Thermal Processing of Meat Products. In: SUN, D. (Ed). **Thermal Food Processing: New Technologies and Quality issues**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p.155- 196.

TIAN, L. **Thermal degradation of antibiotic residues: amphenicols as a case study**. Thesis (Doctorate), Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal/Canada, 2016.

TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 493-508, 2005.

UNIÃO EUROPEIA. European Community. Commission Decision 2002/657/EC of 17 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, **Off. J. Eur. Commun.** 2002, L221/8-L221/36. ISO 11843-1:1997, *Capability of detection – Part 1: Terms and definitions*.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão Europeia. Regulamento (UE) nº 875/2010a da comissão de 05 out. de 2010 relativo a autorização por 10 anos de um aditivo na alimentação para animais. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, n. 263,

06 out. 2010, p. 4-6. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/875/oj>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão Europeia. Regulamento (UE) nº 885/2010b da comissão de 07 out. de 2010 relativo à autorização da preparação de narasina e nicarbazina como aditivo na alimentação de frangos de engorda (detentor da autorização Eli Lilly and Company Ltd) e que altera o Regulamento (CE) nº 2430/1999. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, n. 265, 08 out. 2010, p. 5-7. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32010R0885>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão Europeia. **Evaluation Report on the Analytical Methods submitted in connection with the Application for Authorisation of Feed Additive according to Regulation (EC) No 1831/2003**. Monteban G100. 19/01/2016. Disponível em: <<https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/finirep-FAD-2015-0001-monteban.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

USDA (United States Department of Agriculture). Economic Research Service. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. 2018. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2019.


U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. TOXNET – Toxicology Data Network. ChemIDplus. **Nicarbazin**. Disponível em: <<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/name/nicarbazin>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. PubChem. **p-nitroaniline**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-nitroaniline>>. Acesso em: 01 mai. 2019.

VALESE, A. C.; MOLOGNONI, L.; SOUZA, N. C.; PLOÊNCIO, L. A. S.; COSTA, A. C. O.; BARRETO, F.; DAGUER, H. Development, validation and different approaches for the measurement uncertainty of a multi-class veterinary drugs residues LC–MS method for feeds. **Journal of Chromatography B**, v. 1053, p. 48–59, 2017.

XIE, W. C.; GU, X. H.; TAN, Z. C.; TANG, J.; WANG, G. Y.; LUO, C. R.; SUN, L. X. Thermal decomposition of two synthetic glycosides by TG, DSC and simultaneous Py-GC-MS analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, p. 505–510, 2007.

APÊNDICE 1 – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUA) DA EMBRAPA SUÍNOS E AVES PARA A CRIAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

	Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Experimentação e/ou ensino	CEUA 1/4
---	--	-------------

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO
PROTOCOLO Nº 013/2016
RECEBIDO EM: 28/11/2016

No campo “fármaco”, deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf.

Obs.: Todos os campos devem ser preenchidos. Em caso de não se aplicar, preencher “não se aplica”.

1. PRAZO			
Data Início:	15/12/2016	Data Término:	30/06/2019

2. TÍTULO DO PROJETO/AULA PRÁTICA/TREINAMENTO	
Uso da nicarbazina na produção de frangos de corte com reutilização da cama	
Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra / Química / Química Analítica / Análises de Traços e Química Ambiental	


Lista das áreas do conhecimento disponível em: <http://www.cnpq.br/areasconhecimento/index.htm>.

3. RESPONSÁVEL			
Nome completo:	Vivian Feddern		
Instituição:	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária		
Unidade:	Suínos e Aves		
Departamento / Disciplina:	Pesquisa/Química		
Experiência Prévia:	(X) Sim. Quanto tempo? 8 anos		() Não
Treinamento:	() Sim. Quanto tempo? X anos		(X) Não
Vínculo com a instituição:	(X) Docente / Pesquisador	() Téc. Nível Superior	() Jovem pesquisador / Pesquisador Visitante
Telefone:	(49) 3441-0235		
e-mail:	vivian.feddern@embrapa.br		

4. COLABORADORES	
Nome completo:	Luizinho Caron
Instituição:	Embrapa Suínos e Aves
Nível acadêmico:	Doutorado
Experiência prévia (anos):	16
Treinamento (especificar):	Microbiologia; Virologia; Vacinas recombinantes
Telefone:	(49) 3441-0400
E-mail:	luizinho.caron@embrapa.br

4. COLABORADORES	
Nome completo:	Arlei Coldebella
Instituição:	Embrapa Suínos e Aves
Nível acadêmico:	Doutorado
Experiência prévia (anos):	18
Treinamento (especificar):	Estatística
Telefone:	(49) 3441-0298
E-mail:	arlei.coldebella@embrapa.br

4. COLABORADORES	
Nome completo:	Danniele Miranda Bacila

	Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Experimentação e/ou ensino	CEUA 1/4
---	---	---------------------

Instituição:	Universidade Federal do Paraná
Nível acadêmico:	Mestrado
Experiência prévia (anos):	8
Treinamento (especificar):	Boas Práticas; HACCP; Segurança dos Alimentos
Telefone:	(41) 3361 – 3273
E-mail:	dannielemiranda@ufpr.br

4. COLABORADORES

Nome completo:	Anildo Cunha Junior
Instituição:	Embrapa Suínos e Aves
Nível acadêmico:	Mestrado
Experiência prévia (anos):	15
Treinamento (especificar):	Química analítica
Telefone:	(49) 3441-0400
E-mail:	anildo.cunha@embrapa.br

4. COLABORADORES

Nome completo:	Vanessa Gressler
Instituição:	Embrapa Suínos e Aves
Nível acadêmico:	Doutorado
Experiência prévia (anos):	10
Treinamento (especificar):	Toxicologia
Telefone:	(49) 3441-0400
E-mail:	vanessa.gressler@embrapa.br

4. COLABORADORES

Nome completo:	Gerson Neudí Scheuermann
Instituição:	Embrapa Suínos e Aves
Nível acadêmico:	Doutorado
Experiência prévia (anos):	23
Treinamento (especificar):	Manejo, nutrição
Telefone:	(49)3441-0400
E-mail:	gerson.scheuermann@embrapa.br


Utilize esta tabela para o preenchimento de um colaborador. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os colaboradores sejam contemplados.

4.1 MÉDICO(S) VETERINÁRIO(S) RESPONSÁVEL(IS) PELOS ANIMAIS DURANTE A REALIZAÇÃO DA(S) ATIVIDADE(S)

Luiz Carlos Bordin

5. RESUMO DO PROJETO/AULA

A nicarbazina é amplamente utilizada para prevenir a coccidiose em frangos, principalmente devido ao seu custo-benefício e menor resistência das *Eimerias* quando comparada a outros anticoccidianos. A principal preocupação com o uso da nicarbazina em frangos de corte é a presença de resíduos na carne ou miúdos comestíveis. A nicarbazina origina dois metabólitos no fígado: HDP, eliminado 90-95% na urina e DNC, parcialmente excretado nas fezes (46%), que pode contaminar as carcaças de frangos e órgãos. Embora diversos países considerem suficiente o período de retirada da nicarbazina para evitar desvios quanto aos limites máximos de resíduos na carne, contaminações ainda ocorrem. O Brasil segue os limites indicados pelo *Codex Alimentarius* de 200 ppb para músculo de frango. Segundo histórico do PNCRC do MAPA, nos últimos 5 anos há registros de amostras oriundas de Sistema de Inspeção Federal não conformes quanto ao analito nicarbazina, expresso como DNC. Além disso, um levantamento realizado pela Embrapa Suínos e Aves, publicado em 2015, apontou que os anticoccidianos representam 45% das moléculas de maior interesse para pesquisa na cadeia de aves. Considerando a preocupação com a saúde do consumidor

	Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Experimentação e/ou ensino	CEUA 1/4
---	---	---------------------

com anticoccidianos ionóforos dificulta o surgimento de resistência das *Eimerias*. Saliente-se que a resistência destes protozoários aos demais anticoccidianos é grande preocupação do sistema produtivo.

Uma preocupação atual com qualquer produto em uso, especialmente os de síntese química, é quanto à deposição residual na carcaça destinada ao consumo humano. Como qualquer outro aditivo, a nicarbazina é fornecida com as devidas recomendações do fabricante que visa o êxito no controle das *Eimerias* e a segurança dos alimentos. Entretanto, no Brasil é prática usual a reutilização da cama dos aviários para vários lotes subsequentes de frangos. Não há conhecimento quanto ao potencial de deposição de nicarbazina pelo uso prolongado da cama. Uma vez que é comum o consumo de cama pelos frangos, especialmente no período de jejum pré-abate, é necessário conhecer a contribuição da cama quanto aos resíduos de nicarbazina, o que é importante principalmente devido à reutilização da cama por vários lotes. A partir disso será possível desenvolver programa de uso dos anticoccidianos permitindo utilização da nicarbazina assegurando que a carcaça não extrapole o limite máximo aceitável de resíduos.

No estudo está prevista também a avaliação de diferentes tratamentos térmicos quanto à degradação dos resíduos de nicarbazina. Para tanto será necessário criar aves sem retirar o anticoccidiano antes do abate, visando a produção de tecidos “contaminados”.

Item 8 - O potencial impacto da utilização dos animais para o avanço do conhecimento científico, a saúde humana, e/ou a saúde animal devem ser incluídos neste item. Deve ficar claro que os benefícios potenciais da atividade envolvendo animais em pesquisa ou ensino se sobrepõem às consequências negativas da experimentação animal.


9. MODELO ANIMAL	
Espécie (nome vulgar, se existir):	Gallus gallus (Frango de corte)
Justificar o uso dos procedimentos e da espécie animal:	É necessário saber a deposição de resíduos em tecidos animais, para através dos resultados transmitir segurança aos consumidores e à indústria. Para tanto, serão coletados tecidos de frangos após sacrificados por deslocamento cervical.

Item 9 - O responsável deve justificar a espécie ou grupo taxonômico e os procedimentos a serem empregados em função do sistema biológico a estudado. A opção por um determinado modelo animal deve ter consistência científica e não ser influenciada por conveniência ou orçamento.

9.1. PROCEDÊNCIA			
Biotério, fazenda, aviário, etc.	Pintos de corte de incubatório comercial		
Animal Silvestre:	() Sim	Número de protocolo SISBIO:	(X) Não
Outra procedência? Qual?	Não se aplica.		
O animal é geneticamente modificado?	() Sim	Número de protocolo CTNBio:	(X) Não

Item 9.1 - Obs. 1: A autorização da CEUA não requer a existência de licença prévia de outras instituições. Entretanto, o responsável deve obter todas as autorizações legais cabíveis que a natureza do projeto exigir antes do início das atividades com animais como, por exemplo, autorizações de instituições como Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, Fundação do Nacional do Índio - FUNAI, Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN, Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEN, Coordenação-Geral da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio dentre outras.

Item 9.1 - Obs. 2: O proponente deve priorizar a obtenção de animais de fornecedores credenciados no CONCEA. A aquisição de animais de fornecedores não credenciados deve ser devidamente justificada, observando-se, neste caso, o disposto na Resolução Normativa nº 26 de 29 de

	Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Experimentação e/ou ensino	CEUA 1/4
---	---	---------------------

Parecer dado ao protocolo (assinar e carimbar o parecer):

A presente proposta foi analisada na reunião de 07/10/2016 tendo sido reencaminhada à responsável para maiores esclarecimentos. Após os devidos esclarecimentos a proposta foi encaminhada novamente à CEUA/CNPSA que APROVOU a proposta na reunião ocorrida dia 09/12/2016.



Paulo Augusto Esteves
Presidente CEUA/CNPSA

APÊNDICE 2 – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE BIOSSEGURIDADE (COMBIO) DA EMBRAPA SUÍNOS E AVES PARA A CRIAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

	Consulta prévia para realização de experimentos	CPRE Pág. 1/3
---	--	-------------------------

Preenchimento ComBio: Consulta Nº **009/2017**

1. Líder/Responsável: Vivian Feddern

2. Tipo de Consulta: (Assinale com X)

☐ Projeto/Contrato em elaboração

☒ Projeto/Contrato aprovado. Especifique: Aprovado na Chamada 05/2016 - Prioridades dos Portfólios em 29/05/2017, conforme Chefia Informa deste mesmo dia.

Projeto/ Contrato Nº _____
Título: **Uso da nicarbazina na produção de frangos de corte com reutilização da cama**

3. Período Proposto para a realização do experimento: 13/06/2017 a 15/09/2017

4. Objetivo sucinto:

Este trabalho será efetuado com frangos de corte nas instalações do isolamento, na Embrapa Suínos e Aves. Serão adquiridos pintos de um dia de incubatório comercial.

Objetiva-se conhecer a influência do processamento térmico da carne sobre a depleção do anticoccidiano nicarbazina. Esta análise deve ser feita com tecido contaminado naturalmente durante o processo de criação da ave, uma vez que o comportamento da nicarbazina possivelmente seja diferente quando adicionado artificialmente (injeção de nicarbazina diretamente no tecido após o abate) já relatado na literatura.

5. Animais experimentais: (Assinale com um X)

☐ **SUÍNOS:** ☐ Maternidade ☐ Creche ☐ Crescimento/Terminação ☐ Gestação

Número de Animais Experimentais: _____	
Destino dos animais mortos: () Plataforma de Compostagem () Necropsia () Incinerador () Outro: _____	
O experimento utilizará:	Produtos de origem animal na ração? () Não () Sim. Qual: _____
	Inoculação de micro-organismos? () Não () Sim. Qual: _____
	medicamentos e/ou aditivos na ração? () Não () Sim Qual: _____
	Outras informações importantes: _____

☒ **AVES:** ☒ Frangos de Corte ☐ Postura comercial ☐ Outros: _____

Número de Animais Experimentais:	Total: 72
Destino dos animais mortos: (X) Compostagem () Necropsia	

	Consulta prévia para realização de experimentos	CPRE Pág. 2/3
---	--	-------------------------

		() Incinerador () Outro:
O experimento utilizará:	Produtos de origem animal na ração? (x) Não () Sim. Qual:	
	Inoculação de micro-organismos? (x) Não () Sim. Qual:	
	Medicamentos e/ou aditivos na ração? () Não (x) Sim Qual: nicarbazina (anticoccidiano)	
Outras informações importantes:		
Uso de vacinas		() Não (X) Sim. Qual e que tipo? Gumboro e, possivelmente, bronquite.

6. Local(is) de condução do experimento:

Instalações do Isolamento.

7. Descreva resumidamente a metodologia a ser empregada:

7.1 Informe também:

- a) Número de lotes e animais/lote: ver item c.
- b) Procedência dos animais
() Interno: Sistema de Produção ou SPF
(X) Externo: Incubatório comercial
- c) Período de alojamento: o experimento acontecerá desde junho a setembro de 2017, conforme segue:

Este experimento serve para produzir peito de frango com nicarbazina para avaliação de diferentes processamentos térmicos. Para isso será adicionado à ração 180 ppm de nicarbazina por kg de frango (um único tratamento). Aos 42 dias de idade, após abate, será coletado o peito das aves.

Serão alojadas 12 aves por semana, durante seis semanas (total 72 aves), utilizando de 4 a 5 boxes/baixas do isolamento.



Se possível, faremos o abate no abatedouro, se não for possível/permitido, utilizaremos a sala de necrópsia. Os tecidos coletados serão utilizados em análise posterior (processamento térmico), mas não destinados para consumo humano.

- d) Procedência do alimento: ração para frangos com ingredientes exclusivamente de origem vegetal, homogeneizados em misturador tipo Y na fábrica de ração da Embrapa Suínos e Aves.

- e) Medidas usadas para desinfecção das instalações ao final do experimento: Procedimentos normais utilizados na Embrapa Suínos e Aves.

8. Destino dos animais ao final da pesquisa:

Todos os frangos serão abatidos para a coleta de material (tecido cárneo) aos 42 dias de idade. A ração conterá o anticoccidiano nicarbazina, produto autorizado pelo

 Suínos e Aves	Consulta prévia para realização de experimentos	CPRE Pág. 3/3
MAPA.		
9. Outras informações relevantes:		
A proposta foi encaminhada ao CEUA em 28/11/2016 e aprovada dia 09/12/2016, protocolada sob nº 013/2016.		
10. Pessoas envolvidas na execução do trabalho:		
Vivian Feddern – Embrapa Luizinho Caron - Embrapa Arlei Coldebella - Embrapa Valdir S. De Ávila - Embrapa Gerson N. Scheuermann - Embrapa Anildo Cunha Jr. - Embrapa Vanessa Gressler - Embrapa Diego Surek - Embrapa Danniele Miranda Bacila – Doutoranda UFPR		
11. Parecer do ComBio: (X) Autoriza () Autoriza com ajustes () Não autoriza		
Orientações:		
Prezada pesquisadora,		
<p>Em resposta a sua solicitação, encaminhada em 06/06/2017, a presidente deste Comitê, Danielle Gava, formalizou a consulta enviada por email, referente a experimento com frangos de corte nas instalações do isolamento, a fim de verificar a influência do processamento térmico da carne sobre a depleção do anticoccidiano nicarbazina.</p>		
<p>O ComBio autoriza a realização do experimento nas instalações do isolamento, todavia ressalta que as baias solicitadas são para uso de suínos e têm prioridade de uso para esses animais. Sendo assim, recomenda-se que a solicitação de uso dessa estrutura deve ser verificada com antecedência junto ao supervisor do CLGSA, Marcos Morés. Também, haverá necessidade de adaptação dessas baias para uso de aves, distribuição de cama, instalação de bebedouros de aves (não disponíveis no local) e arranjo de equipe para atender as aves em feriados e finais de semana. Estas ações, bem como o fluxograma e normas de uso das instalações deverão ser ajustados pela líder da pesquisa junto ao supervisor do CLGSA com a devida antecedência ao início do experimento. Além disto, caso a cama seja reutilizada e proveniente de fora da Embrapa, recomendamos consultar e obter anuência prévia da CIDASC para transporte desse material até o local. Com relação ao destino da cama e aves, ao final do experimento, também recomendamos verificar junto ao supervisor do CLGSA se o sistema definido (compostagem), comportará o volume de material a ser descartado.</p>		
<p>Lembramos também que a equipe do experimento deverá contar com um médico veterinário habilitado a emitir GTA dos pintos de um dia, a qual deverá ser direcionada à UEP 20.</p>		
Cordialmente,		
Presidente do ComBio OS 008/2017		
Nome: Danielle Gava		
Assinatura: 		
Concórdia, 19/06/2017		

APÊNDICE 3– COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES POR FASE DE CRIAÇÃO DOS FRANGOS DE CORTE

COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES POR PERÍODO (EM PERCENTUAL)			
Ingrediente	1-21 dias	21 - 35 dias	35-42 dias
Milho	57,04	57,70	63,23
Farelo de Soja	36,34	33,98	29,11
Óleo de Soja	1,97	4,46	4,40
DL-Metionina	0,34	0,28	0,24
L-Lisina HCl	0,19	0,15	0,17
L-Treonina HCl	0,09	0,05	0,04
Fosfato bicálcico	1,84	1,54	1,15
Calcário calcítico	0,97	0,75	0,71
Sal Comum	0,51	0,48	0,43
Premix Vitamínico-Mineral*	0,400	0,300	0,270
Cloreto de Colina (60%)	0,010	0,010	0,010
Antioxidante BHT	0,020	0,020	0,020
Nicarbazina (25%)	0,072	0,072	0,072
Avilamicina (20%)	0,005	0,005	0,00
Adsorvente Micotoxinas	0,20	0,20	0,15
Total	100,00	100,00	100,00

Composição calculada			
Energia Metabolizável	3000	3130	3200
Proteína Bruta	21,5	20,4	18,6
Fibra bruta	2,6	2,8	2,6
Gordura	5,1	7,1	7,2
P total	0,66	0,60	0,51
P disponível	0,44	0,38	0,30
Ca	0,88	0,76	0,64
Cinzas	6,15	5,48	4,79
Na	0,22	0,21	0,19
LYS dig	1,20	1,10	1,00
MET dig	0,63	0,55	0,49
MET + CIS dig	0,92	0,83	0,75
THR dig	0,82	0,74	0,67
TRP dig	0,25	0,23	0,20
ARG dig	1,35	1,27	1,14
GLI + SER dig	1,71	1,70	1,54
Val dig	0,91	0,86	0,78

*Fornecido por kg do produto: Vitamina A, 3.213.000 UI; Vitamina D3, 803.500 UI; Vitamina E, 12.035 UI; Vitamina K3, 643 mg; Tiamina, 864 mg; Riboflavina, 2.150 mg; Piridoxina, 1.204 mg; Cianocobalamina, 5.350 mcg; Ácido Fólico, 300 mg; Ácido Pantotênico, 4.317 mg; Biotina, 30 mg; Niacina, 133.067 mg; Colina, 130.667 mg; Cobre, 2.767 mg; Ferro, 13.900 mg; Iodo, 282 mg; Manganês, 19.467 mg; Selênio, 83 mg; Zinco, 18.070 mg.

APÊNDICE 4 – AUTORIZAÇÃO PARA USO DE RESULTADOS DA TESE PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Request for permission

<https://mail.google.com/mail/u/1?ik=f0d8a7e26a&view=pt&s>

Danniele Bacila <dannielebacila@gmail.com>

Request for permission

3 messages

Danniele Bacila <dannielebacila@gmail.com>
To: jafc@jafc.acs.org

Wed, Nov 28, 2018 at 1:26 PM

Dear Editor,

Our team published an article in "Journal of Agricultural and Food Chemistry".
I am the first author and I would like to include the published text, although translated to Portuguese, in my Thesis, which I'm going to defend in April, 2019 in Curitiba, Parana state, Brazil. I'd like to request your permission, I'll cite in the Thesis, the following information:

"Reproduced with permission from [Bacila, D.M., Cunha, A., Weber, I.F., Scheuermann, G.N., Coldebella, A., Caron, L., Molognoni, L., Daguer, H., Igarashi Mafra, L., Feddern, V., 2018. Degradation of 4,4'-Dinitrocarbanilide in Chicken Breast by Thermal Processing. J. Agric. Food Chem. 66, 8391–8397. doi:10.1021/acs.jafc.8b02370] Copyright [2018] American Chemistry Society"

Your sincerely,
Danniele Miranda Bacila

Universidade Federal do Paraná- UFPR
Centro Politécnico - Setor de Tecnologia
Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 210
Jardim das Américas - Curitiba- Paraná, Brazil
CEP 81531-970
Phone: +55 41 3361 3273

Ivonne Hofmann-Sellier <hofmann-office@jafc.acs.org>
To: Danniele Bacila <dannielebacila@gmail.com>

Sat, Dec 1, 2018 at 8:49 AM

Dear Danniele Miranda Bacila,

I talked with our editor - of course he gives his permission!

Best,
Ivonne

Ivonne Hofmann-Sellier
Journal of Agricultural and Food Chemistry
Editorial Assistance to
Prof. Dr. Thomas Hofmann Editor in Chief
hofmann-office@jafc.acs.org
jafc@jafc.acs.org

[Quoted text hidden]

Danniele Bacila <dannielebacila@gmail.com>
Draft To: hofmann-office@jafc.acs.org

Mon, Dec 3, 2018 at 8:38 AM

Dear Ivonne,
Thank you very much.
I got from the Jafc's website the on-line license.
Document attached for your information.



RightsLink®

[Home](#)
[Create Account](#)
[Help](#)


Title: Degradation of 4,4'-Dinitrocarbanilide in Chicken Breast by Thermal Processing

Author: Danniele Miranda Bacila, Anildo Cunha, Indianara Fabiola Weber, et al

Publication: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Aug 1, 2018

Copyright © 2018, American Chemical Society

LOGIN

If you're a [copyright.com](#) user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials.

Already a [RightsLink](#) user or want to [learn more?](#)

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

15/08/2019

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Create Account

Help

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Title:

Detection of p-Nitroaniline Released from Degradation of 4,4'-Dinitrocarbanilide in Chicken Breast during Thermal Processing

Author:

Danniele Miranda Bacila, Anildo Cunha, Vanessa Gressler, et al

Publication:

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Publisher:

American Chemical Society

Date:

Aug 1, 2019

Copyright © 2019, American Chemical Society

LOGIN

If you're a [copyright.com](#) user, you can login to RightsLink using your [copyright.com](#) credentials.Already a [RightsLink](#) user or want to [learn more?](#)

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

**APÊNDICE 5 – RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE (QC) PARA O ANALITO DNC NA MATRIZ
PEITO DE FRANGO**

Nº	Amostra	Ensaio	Nível de Fortificação (ng g ⁻¹)	DNC (301.0 -> 136.7)	DNC (308.7 -> 140.6)	Razão	[DNC] ng mL ⁻¹	FD	[DNC] ng mL ⁻¹	Volume inicial (mL)	Massa absoluta DNC (ng)	[DNC] (ng g ⁻¹)	Exatidão (%)
1	QC 13-09-17	Cozimento	200	1874000	4429000	0,42	21,30	1	21,30	50	1065	212,95	106
2	QC 13-09-17		200	1946000	4632000	0,42	21,14	1	21,14	50	1057	211,43	106
3	QC 13-09-17		200	1648000	3956000	0,42	20,96	1	20,96	50	1048	209,64	105
4	QC 13-09-17		200	1701000	3844000	0,44	22,28	1	22,28	50	1114	222,80	111
5	QC 16-10-17	Grelha	200	1860000	3610000	0,52	19,11	1	19,11	50	956	191,12	96
6	QC 16-10-17		200	1931000	4045000	0,48	17,71	1	17,71	50	886	177,10	89
7	QC 19-10-17	Micro-ondas	200	2257000	5834000	0,39	19,32	1	19,32	50	966	193,17	97
8	QC 19-10-17		200	2330000	6003000	0,39	19,38	1	19,38	50	969	193,81	97
9	QC 20-10-17		200	2269000	5785000	0,39	19,59	1	19,59	50	979	195,87	98
10	QC 20-10-17		200	2190000	5488000	0,40	19,93	1	19,93	50	997	199,32	100
11	QC 13-11-17	Fritura	200	87500	20192	4,33	18,91	1	18,91	50	946	189,11	95
12	QC 13-11-17		200	89201	20547	4,34	18,94	1	18,94	50	947	189,45	95
13	QC 14-11-17		200	112768	26171	4,31	18,81	1	18,81	50	940	188,06	94
14	QC 14-11-17		200	121089	27849	4,35	18,97	1	18,97	50	949	189,74	95
15	QC 20-11-17	Forno	200	118578	27777	4,27	18,69	1	18,69	50	935	186,92	93
16	QC 20-11-17		200	120270	28016	4,29	18,80	1	18,80	50	940	187,96	94
17	QC 21-11-17		200	120519	28098	4,29	18,78	1	18,78	50	939	187,80	94
18	QC 21-11-17		200	117151	27350	4,28	18,75	1	18,75	50	938	187,55	94
19	QC 27-11-17	Comparativo entre tratamentos	200	123100	28665	4,29	18,48	1	18,48	50	924	184,77	92
20	QC 27-11-17		200	123069	28779	4,28	18,40	1	18,40	50	920	184,00	92
21	QC 28-11-17		200	126956	29560	4,29	18,48	1	18,48	50	924	184,79	92

Nº	Amostra		Nível de Fortificação (ng g ⁻¹)	DNC (301.0 -> 136.7)	DNC (308.7 -> 140.6)	Razão	[DNC] ng/mL	FD	[DNC] ng mL ⁻¹	Volume inicial (mL)	Massa absoluta DNC (ng)	[DNC] (ng g ⁻¹)	Exatidão (%)
22	QC 28-11-17		200	123175	28692	4,29	18,47	1	18,47	50	924	184,71	92
23	QC 28-11-18		200	124818	28606	4,36	18,77	1	18,77	50	939	187,72	94
24	QC 28-11-19		200	125766	29358	4,28	18,43	1	18,43	50	922	184,32	92
25	QC 20-12-17		200	122076	28653	4,26	18,50	1	18,50	50	925	184,97	92
26	QC 20-12-17		200	121645	28759	4,23	18,36	1	18,36	50	918	183,63	92
27	QC 20-12-17		200	136201	31865	4,27	18,56	1	18,56	50	928	185,57	93
28	QC 20-12-17		200	132229	31313	4,22	18,33	1	18,33	50	917	183,33	92

APÊNDICE 6 – RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE (QC) PARA O ANALITO *p*-NA NA MATRIZ PEITO DE FRANGO

Nº	Nível de fortificação (ng g ⁻¹)	PNA (242.9-> 105.2)	Anilina (198-> 105.2)	Razão Área	Razão PNA/IS	IS (ng)	Massa amostra liofilizada (g)	MS-Lio (%)	Massa amostra in natura (g)	IS (ng g ⁻¹)	PNA (ng g ⁻¹)	Exatidão (%)
1	500	241548	791928	0,30	11,30	500	2,50	25	10,00	50,00	565	113
2	500	225131	821066	0,27	10,16	500	2,50	25	10,00	50,00	508	102
3	500	447422	1150077	0,39	10,51	500	2,50	25	10,00	50,00	526	105
4	500	433355	1226801	0,35	9,55	500	2,50	25	10,00	50,00	477	95
5	500	495807	1249685	0,40	9,63	500	2,50	25	10,00	50,00	481	96
6	500	565872	1254917	0,45	10,94	500	2,50	25	10,00	50,00	547	109
7	500	713142	1152996	0,62	11,45	500	2,50	25	10,00	50,00	573	115
8	500	751781	1372975	0,55	10,11	500	2,50	25	10,00	50,00	505	101
9	500	463620	1309868	0,35	10,11	500	2,50	25	10,00	50,00	506	101
10	500	447458	1346476	0,33	9,49	500	2,50	25	10,00	50,00	475	95